

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 décembre 2003 (18.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/104228 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07D 455/06, 471/14

des Doves, Résidence de la Chanterie, F-86000 Poitiers
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/01688

(74) Mandataires : DEMACHY, Charles etc.; Gros-
set-Fournier & Demachy S.a.r.l., 54, rue Saint-Lazare,
F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 5 juin 2003 (05.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/06916 5 juin 2002 (05.06.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR). UNIVERSITE DE POITIERS [FR/FR];
15, rue de l'Hôtel Dieu, F-86034 Poitiers Cedex (FR).

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BECQ,
Frédéric [FR/FR]; Bourgueil, F-86300 Bonnes (FR).
ROBERT, Renaud [FR/FR]; 7, avenue Mozart, Résidence
Charlemagne, App. 35, F-86000 Poitiers (FR). PIG-
NOUX, Laurence [BE/FR]; 3, rue de la Vallée Chauveau,
F-86800 Jardres (FR). ROGIER, Christian [FR/FR]; 22,
rue du Maréchal Foch, F-86000 Poitiers (FR). METTEY,
Yvette [FR/FR]; 5, rue de l'ancienne Comédie, F-86000
Poitiers (FR). VIERFOND, Jean, Michel [FR/FR]; 2, rue
Molière, F-94700 Maisons Alfort (FR). JOFFRE, Michel
[FR/FR]; 16, rue des Arènes Romaines, F-86000 Poitiers
(FR). MARIVINGT-MOUNIR, Cécile [FR/FR]; 30, rue

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 03/104228 A1

(54) Title: USE OF BENZO[C]QUINOLIZINIUM DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF DISEASES THAT ARE LINKED
TO SMOOTH MUSCLE CELL CONSTRICTION

(54) Titre : UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES
LIEES AUX PHENOMENES DE CONSTRICTION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

(57) Abstract: The invention relates to the use of benzo[c]quinolizinium derivatives for treating diseases that are linked to smooth
muscle cell constriction, such as hypertension and asthma.

(57) Abrégé : La présente invention a pour l'utilisation de dérivés des benzo[c]quinoliziniums dans le cadre du traitement de patho-
logies liées aux phénomènes de constriction des cellules musculaires lisses, telles que l'hypertension artérielle, ou l'asthme.

UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES LIEES AUX PHENOMENES DE CONSTRICTION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de dérivés des benzo[c]quinoliziniums dans le cadre du traitement de pathologies liées aux phénomènes de constriction des cellules musculaires lisses, telles que l'hypertension artérielle, ou l'asthme.

10

De nombreux activateurs moléculaires ont été synthétisés en vue de leur utilisation éventuelle dans le cadre du traitement de la mucoviscidose (Becq *et al.*, 1999; WO 98/05642). De ces synthèses chimiques sont apparues une série de composés substitués du benzo[c]quinolizinium (MPB) et, parmi ces molécules, les composés MPB-07 et MPB-91. Dans des cellules exprimant la protéine CFTR de manière endogène, il a été démontré, par des techniques d'efflux iodure et de patch clamp, que les MPB-07 et MPB-91 sont des activateurs de ce canal ionique (Becq *et al.*, 1999, Dérand *et al.*, 2001). Les inventeurs ont montré que ces deux molécules modifient la localisation de $\Delta F508$ -CFTR dans les cellules pulmonaires de patients homozygotes pour cette mutation, et qu'une activation du canal $\Delta F508$ est restaurée après traitement (Dormer *et al.*, 2001). Le mécanisme d'action n'est pas établi mais ces deux molécules n'affectent pas l'activité ATPase des deux sites NBF (Dérand *et al.*, 2001), ni le taux d'AMPc intracellulaire ni les activités phosphatases et kinases des principales enzymes impliquées dans la régulation de CFTR (Becq *et al.*, 1999, Dérand *et al.*, 2001).

15

20

25

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs des effets du MPB-07 et du MPB-91 sur la réactivité vasculaire. Les inventeurs ont utilisé l'aorte de rat, organe ayant la propriété de se contracter (vasoconstriction) ou de se relaxer (vasorelaxation) sous l'action de différents agents moléculaires (endogènes ou exogènes) ou mécaniques.

30

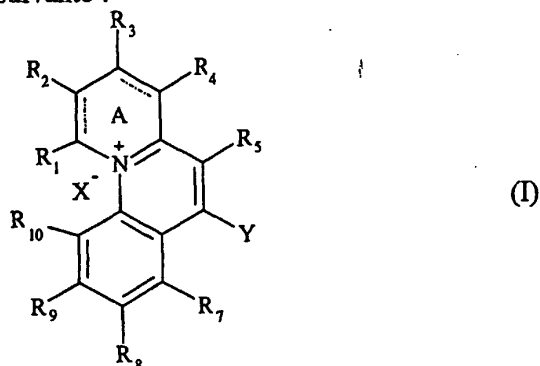
Ainsi les inventeurs ont démontré que les benzo[c]quinoliziniums décrits ci-après dans le cadre de la présente invention, tels que le MPB-07 et le MPB-91, sont des molécules capables de moduler le tonus vasculaire chez l'homme et chez

le rat en agissant sur l'activité des cellules musculaires lisses. De plus, les inventeurs ont démontré que CFTR est exprimé et fonctionnel dans le muscle lisse. Ces résultats démontrent qu'une molécule qui se révélerait être activatrice de CFTR, peut agir comme un vasorelaxant et un broncho-dilatateur potentiel.

5 A ce titre, la présente invention a pour but de fournir de nouveaux médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de
10 bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés activateurs du canal CFTR, tels que les benzo[c]quinoliziniums, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des
15 cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

20 La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de dérivés de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

30 - l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

- $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7, R_8, R_9$ et R_{10} , représentent, indépendamment les uns des autres :

. un atome d'hydrogène, ou

. un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome, ou de fluor, ou

. un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

. un cycle aromatique ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

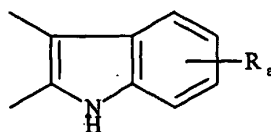
. un groupe $-OR_a$, R_a représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-NR_bR_c$, R_b et R_c , indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R_1 et R_2 , et/ou R_3 et R_4 , et/ou R_4 et R_5 , et/ou R_7 et R_8 , et/ou R_8 et R_9 , et/ou R_9 et R_{10} , ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_2 , et/ou R_2 en association avec R_3 , et/ou R_3 en association avec R_4 , et/ou R_4 en association avec

R₅, et/ou R₇ en association avec R₈, et/ou R₈ en association avec R₉, et/ou R₉ en association avec R₁₀, forment respectivement avec C₁ et C₂, ou avec C₂ et C₃, ou avec C₃ et C₄, ou avec C₄, C_{4a} et C₅, ou avec C₇ et C₈, ou avec C₈ et C₉, ou avec C₉ et C₁₀, un cycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R₃ et R₄ ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R₃ en association avec R₄ forment un groupe indole de formule



dans laquelle R_a est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

. un groupe -OR_d, R_d représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe -NR_eR_f, R_e et R_f indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,

. ou un groupe SH,

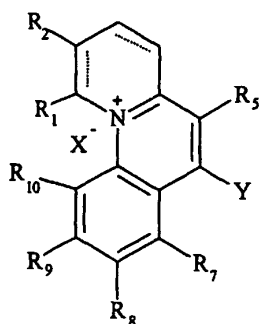
. étant entendu que lorsque R_d, ou l'un au moins de R_e ou de R_f, ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_d, ou l'un au moins de R_e ou de R_f, en association avec R₅, ou en association avec R₇, forment respectivement avec C₅ et C₆, ou avec C₆, C_{6a} et C₇, un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas

échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

- X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus, étant entendu que lorsque R₁ et R₁₀ ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R₁ en association avec R₁₀ forment avec C₁, l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C₁₁, et C₁₀, un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus.

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c] quinoliziniums de formule (Ia) suivante :



(Ia)

dans laquelle :

- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- R₅ représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle, ou un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle,

- Y représente un groupe -OH, -SH, -NH₂, ou -NHCOCH₃,

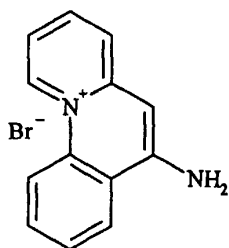
- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

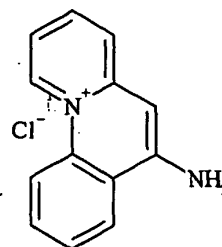
L'invention a également plus particulièrement pour objet des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) tels que définis ci-dessus, dans laquelle Y représente un groupe -NH₂, ou -NHCOCH₃.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

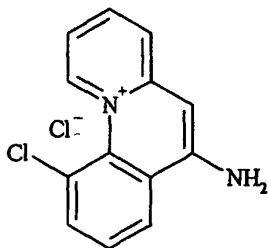
composé 13 (MPB-01)



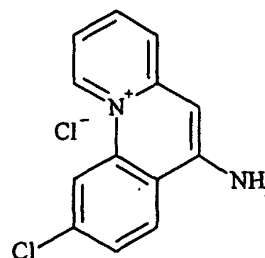
composé 11 (MPB-26)



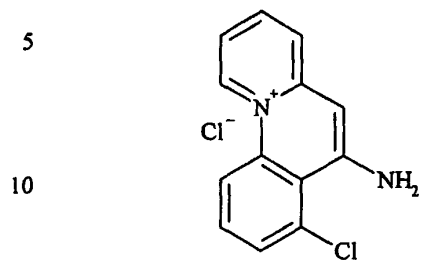
composé 14 (MPB-02)



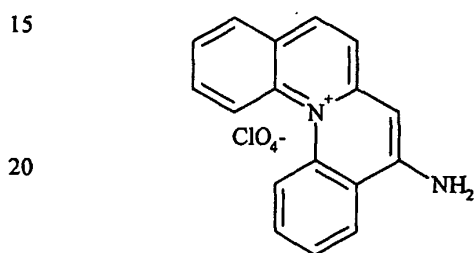
composé 15 (MPB-03)



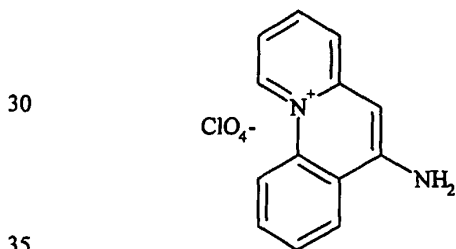
composé 16 (MPB-04)



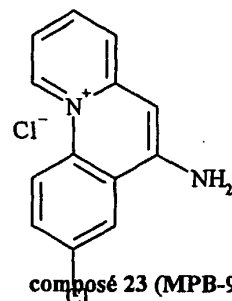
composé 22



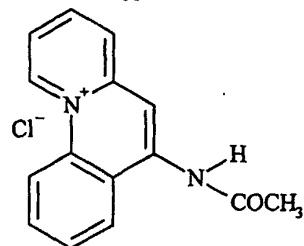
composé 24



composé 17



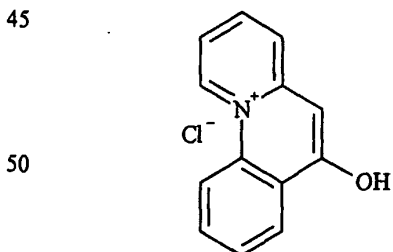
composé 23 (MPB-98)



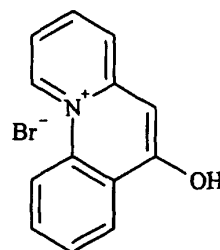
L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c] quinoliziniums de formule (Ia) tels que définis ci-dessus, dans laquelle Y représente OH.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

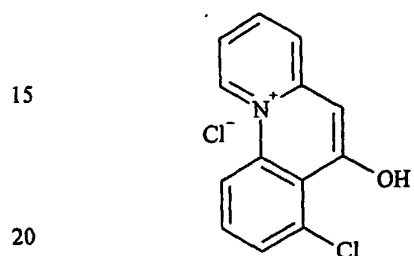
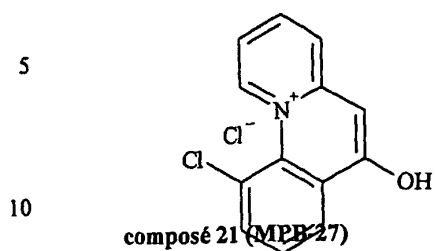
composé 12 (MPB-05)



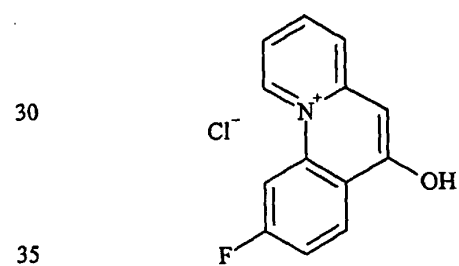
composé 18 (MPB-06)



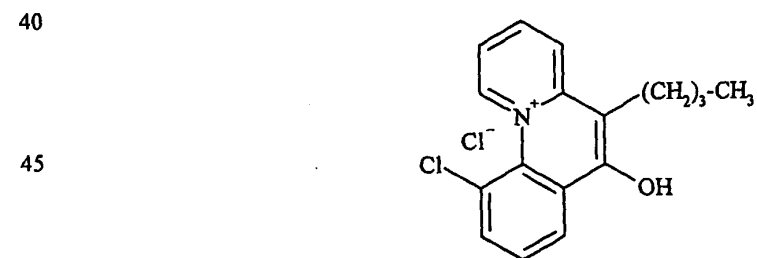
composé 19 (MPB-07)



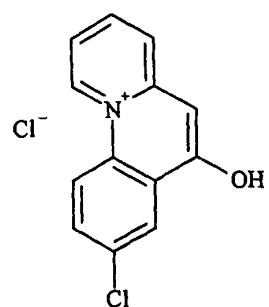
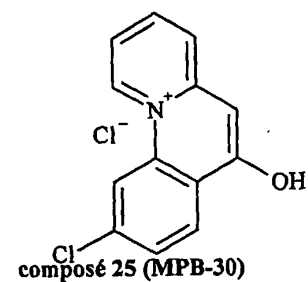
composé 26 (MPB-29)



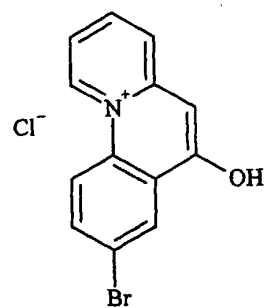
composé MPB-91



composé 20 (MPB-08)

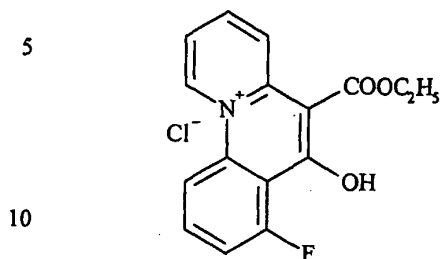


composé 27 (MPB-32)

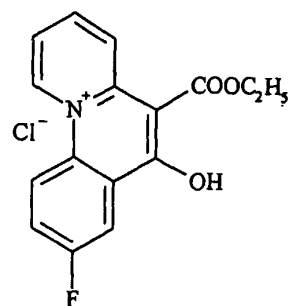


composé 20 (MPB-08)

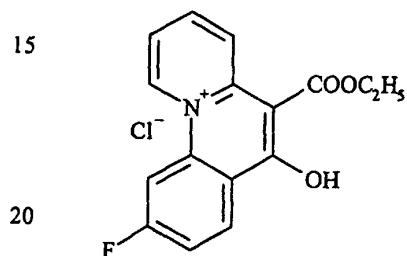
composé MPB 73



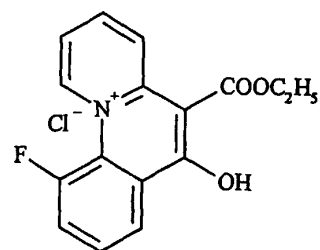
composé MPB 75



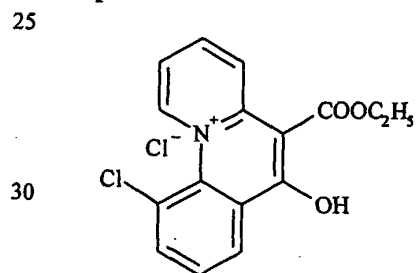
composé MPB 86



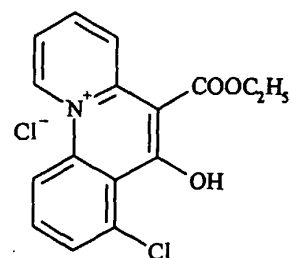
composé MPB 77



composé MPB 87



composé MPB 88



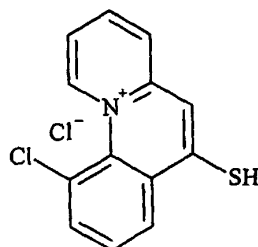
35

L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c] quinoliziniums de formule (Ia) tels que définis ci-dessus, dans laquelle Y représente SH.

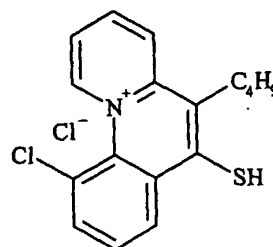
A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

40

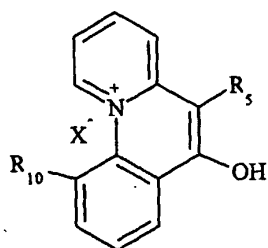
composé MPB 102



composé MPB 103



L'invention concerne également l'utilisation telle que décrite ci-dessus de dérivés de formule générale (Ia-1) suivante :



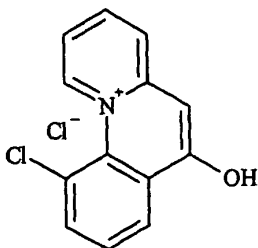
(Ia-1)

dans laquelle :

- R₅ représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,
- R₁₀ représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

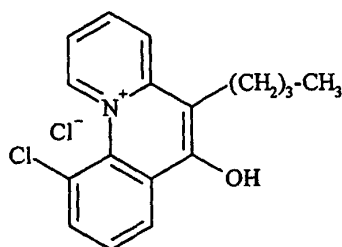
L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée du dérivé de formule (Ia-1) définie ci-dessus, et correspondant au composé MPB-07 de formule suivante :

composé 19 (MPB-07)

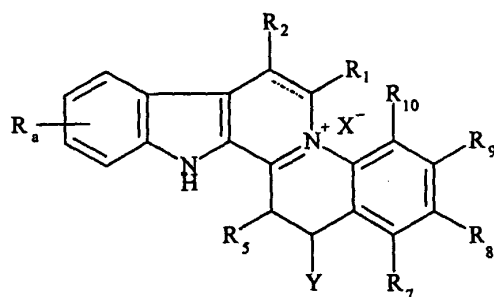


L'invention concerne plus particulièrement également l'utilisation susmentionnée du dérivé de formule (Ia-1) définie ci-dessus, et correspondant au composé MPB-91 de formule suivante :

composé MPB-91



L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de dérivés de formule générale (Ib) suivante :



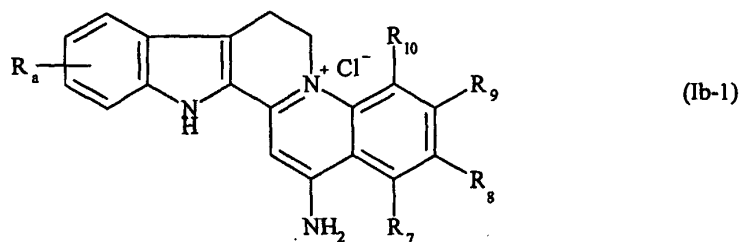
(Ib)

dans laquelle R_a , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (Ib) dans laquelle :

- R_a représente un atome d'hydrogène,
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
- R_5 représente un atome d'hydrogène,
- R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente NH_2 , ou OH ,

- X représente un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de dérivés de formule (Ib-1) suivante :



dans laquelle R_a , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , sont tels que définis ci-dessus,

et plus particulièrement les composés de formule (Ib-1) suivants :

- composé G : $R_7 = \text{Cl}$, $R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,

- composé H : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,

- composé I : $R_8 = \text{Cl}$, $R_7 = R_9 = R_{10} = \text{H}$,

- composé J : $R_9 = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$,

- composé K : $R_{10} = \text{Cl}$, $R_7 = R_8 = R_9 = \text{H}$,

- composé L : $R_9 = \text{Br}$, $R_7 = R_8 = R_{10} = \text{H}$.

L'invention a également pour objet les composés de formule (I) susmentionnée dans laquelle R_5 représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle.

L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle :

- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C_1 et C_2 un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- R_5 représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle,

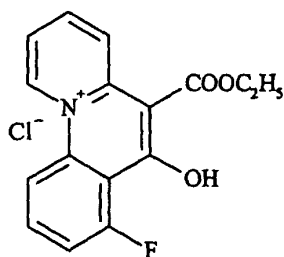
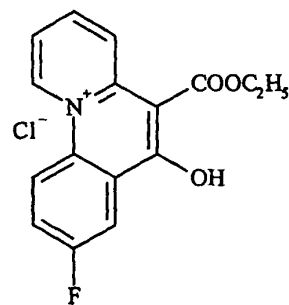
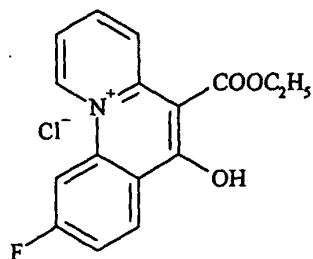
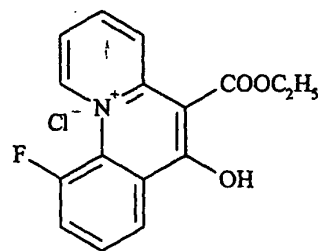
- Y représente un groupe $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, ou $-\text{NHCOCH}_3$,

- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

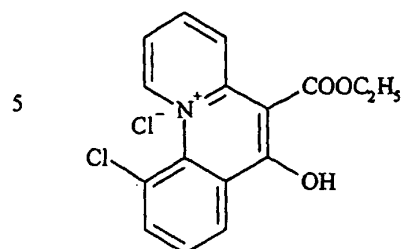
- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore les composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle R₅ représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle, et Y représente un groupe -OH.

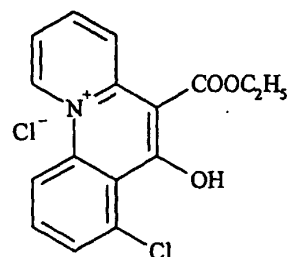
A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement les composés de formule (Ia) susmentionnée, et répondant aux formules suivantes :

composé MPB 73**composé MPB 75****composé MPB 86****composé MPB 77**

composé MPB 87



composé MPB 88



L'invention a également pour objet les composés de formule (I) susmentionnée dans laquelle Y représente SH.

L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle :

- 15
- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
 - R₅ représente - R₅ représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,
 - Y représente un groupe -SH,

20

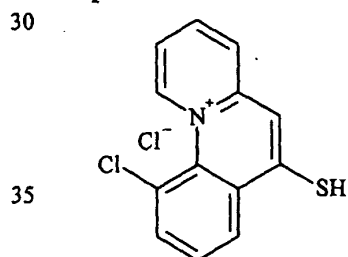
 - R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme

25

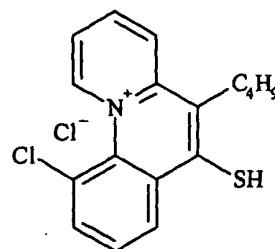
 - anionique.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement les composés de formule (Ia) susmentionnée, et répondant aux formules suivantes :

composé MPB 102



composé MPB 103



L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des composés de formule générale (I) décrite ci-dessus, et plus particulièrement au moins un des composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle R₅ représente un ester de formule
5 COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle, et/ou Y représente SH, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques susmentionnées comprenant au moins le composé MPB 73,
10 MPB 75, MPB 86, MPB 77, MPB 87, MPB 88, MPB 102, ou MPB 103, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

Des compositions pharmaceutiques préférées utilisées dans le cadre de la présente invention sont celles comprenant le composé 19 (encore désigné MPB-07), ou le composé MPB-91, le cas échéant en association avec un (ou plusieurs)
15 autre(s) composé(s) de l'invention décrit(s) ci-dessus.

Avantageusement les compositions pharmaceutiques selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, notamment sous forme de comprimés, ou de gélules, ou sous une forme administrable par voie parentérale, notamment sous forme de préparations injectables par voie intraveineuse,
20 intramusculaire, ou sous-cutanée, ou encore par voie aérienne, notamment par voie pulmonaire sous forme d'aérosols.

Avantageusement encore, les compositions pharmaceutiques selon l'invention, sont caractérisées en ce que les quantités de principe(s) actif(s) sont telles que la posologie journalière en principe(s) actif(s) est d'environ 0,1 mg/kg à
25 5 mg/kg, notamment d'environ 3 mg/kg, en une ou plusieurs prises.

S'agissant de la synthèse des composés de formule (I) de l'invention, celle-ci est amplement détaillée dans la demande internationale WO 98/05642, ainsi que dans l'article de Becq et al., 1999, et de Dérand et al., 2001.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui
30 suit de la synthèse de nouveaux composés de l'invention, et de l'étude des composés de l'invention dans le cadre de la vasodilatation.

I) Préparation des composés MBP 73, MPB 75, MPB 86, MPB 77, MPB 87, et MPB 88

Dans un tricol muni d'une arrivée d'azote et d'une ampoule à brome, une solution de BuLi 0.025 mole est ajoutée goutte à goutte à la seringue à une solution de 4.03 g (0.025 mole) de 1,1,1,3,3,3-hexaméthylidisilazane dans 10 mL de THF (à -5°C). Le mélange est agité à -5°C pendant 30 min. Une solution de 3.30 g (0.02 mole) de 2-pyridylacétate d'éthyle dans 25 mL de THF est ajoutée goutte à goutte sur 2 h. Puis une solution de 0.018 mole de chlorure de benzoyle difluoré (MBP 73, MPB 75, MPB 86, MPB 77), ou dichloré (MPB 87, et MPB 88) dans 10 mL de THF est ajoutée sur 1 h. Le mélange est maintenu sous agitation à -5°C pendant 1 h et 2 h à température du laboratoire. Après hydrolyse par 20 mL d'eau, le solvant est éliminé sous pression réduite.

Les composés cyclisés lors de l'évaporation du solvant de réaction, sont purifiés par chromatographie colonne sur gel de silice, élution par l'acétate d'éthyle.

0.0003 mole des composés précédemment obtenus sont mis en solution dans un mélange de chlorure de méthylène anhydre (5 mL) et d'éther anhydre (50 mL), l'alcool chlorhydrique est ajouté jusqu'à fin de précipitation. Le précipité est filtré sur Büchner puis rincé à l'éther anhydre.

Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-10-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 77

Produit pulvérulent crème

Rendement : 50%

Point de fusion : 134°C

Analyse élémentaire calculée pour $C_{16}H_{13}NO_3ClF$, 0.5 H_2O : C, 58.10 ; H, 4.26 ; N, 4.23. Trouvé C, 58.62 ; H, 3.88 ; N, 4.16.

RMN 1H ($DMSO_d_6$) δ ppm, signal, n protons, attribution : 8.9, pic mal résolu, 1H, H_1 ; 8.2 à 6.9, multiplet, 6H, protons aromatiques ; 6.3, 1H, singulet, OH ; 4.3, quadruplet ($J=7$ Hz), 2H, CH_2 ; 1.3, triplet ($J=7$ Hz), 3H, CH_3 .

IR (KBr) ν cm^{-1} , attribution : 3420 OH, 3171 3080 C=C-H, 2973 C-C-H, 1718 C=O, 1628, 1560, 1520, 1506, 1458, 1312, 1284, 1267, 1193, 1175, 1026, 824, 774.

5 Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-9-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 86

Produit pulvérulent jaune

Rendement : 63%

Point de fusion : 154°C

10 Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{ClF}$: C, 59.73 ; H, 4.07 ; N, 4.35. Trouvé C, 59.58 ; H, 4.10 ; N, 4.28.

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ ppm, signal, n protons, attribution : 9.2, doublet ($J=8$ Hz), 1H, H_1 ; 8.7 à 7.1, multiplet, 6H, protons aromatiques ; 5.7, singulet échangeable, 1H, OH ; 4.3, quadruplet ($J=7$ Hz), 2H, CH_2 ; 1.3, triplet ($J=7$ Hz), 3H, CH_3 .

IR (KBr) ν cm^{-1} , attribution : 3454 OH, 3104 3047 3016 C=C-H, 2960 C-C-H, 1727 C=O, 1609, 1535, 1471, 1435, 1323, 1308, 1259, 1215, 1108, 1017, 831, 764.

20 Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-8-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 75

Produit pulvérulent jaune

Rendement : 28%

Point de fusion : 168°C

25 Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{ClF}$: C, 59.73 ; H, 4.07 ; N, 4.35. Trouvé C, 59.54 ; H, 4.07 ; N, 4.24.

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ ppm, signal, n protons, attribution : 9.4, doublet ($J=9$ Hz), 1H, H_1 ; 8.9 à 8.7, multiplet, 1H, proton aromatique ; 8.2 à 7.0, multiplet, 5H, protons aromatiques ; 6.0, singulet échangeable, 1H, OH ; 4.3, quadruplet ($J=8$ Hz), 2H, CH_2 ; 1.3, triplet ($J=8$ Hz), 3H, CH_3 .

IR (KBr) ν cm^{-1} , attribution : 3500 OH, 3157 3049 C=C-H, 2960 C-C-H, 1670, 1626, 1590, 1532, 1503, 1457, 1323, 1259, 1209, 1006, 885, 792.

Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-7-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 73

5

Produit pulvérulent crème

Rendement : 27%

Point de fusion : 173°C

10 Analyse élémentaire calculée pour $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{ClF}$, 0.5 H_2O : C, 58.10 ; H, 4.26 ; N, 4.23. Trouvé C, 57.99 ; H, 4.12 ; N, 4.97.

RMN ^1H (DMSO-d_6) δ ppm, signal, n protons, attribution : 9.0, doublet ($J=8$ Hz), 1H, H_1 ; 8.4 à 6.8, multiplet, 7H, protons aromatiques + OH ; 4.2, quadruplet ($J=7$ Hz), 2H, CH_2 ; 1.3, triplet ($J=7$ Hz), 3H, CH_3 .

15 IR (KBr) ν cm^{-1} , attribution : 3420 OH, 3160 3101 3046 C=C-H, 2984 C-C-H, 1720 C=O, 1646, 1617, 1601, 1501, 1446, 1409, 1347, 1323, 1274, 1227, 1134, 1011, 814, 779.

5-n-Butyl-10-chloro-6-hydroxybenzo[c]quinolizinium chloride (MPB-91)

20 Le 2-pentylpyridine a été obtenu dans un premier temps par condensation du 2-picolylolithium avec le 1-bromobutane à -40°C , et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice à l'aide de dichloromethane en tant qu'éluent. Puis, le 2-pentylpyridine 4.48 g (0.03 mol) en solution dans du THF (30 mL) a été traité à 0°C avec du diisopropylamide de lithium (0.033 mol), refroidi à -40°C , et le 2,3-dichlorobenzoate de méthyle 3.08 g (0.015 mol) dans du THF (15 mL)
25 a été ajouté. Le mélange a été agité 1 h à -40°C et hydrolysé à 20°C avec 10 mL d'eau. La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 , concentré sous vide et purifiée par chromatographie sur colonne avec de l'éther de pétrole et de l'acétate d'éthyle en tant qu'éluent. Le produit pur a été chauffé à 200°C pendant 1 h. Le résidu a été chromatographié sur florisil avec du dichloromethane afin d'obtenir la cétone
30 cyclique. Cette dernière a été solubilisée dans l'éther anhydre et une solution de HCl/éthanol a été additionnée goutte à goutte. Produit pulvérulent crème ; point

de fusion = 160°C, rendement: 15 %. Anal. $C_{17}H_{17}N_1O_1Cl_2$: C, 63.37; H, 5.32; N, 4.35; Trouvé: C, 63.36; H, 5.27; N, 4.32. IR (KBr): 3439, 3121., 2951, 2923, 2895, 2863, 2496, 2344, 1629, 1589, 1502, 1488, 1457, 1400. 1H NMR (Me_2SO-d_6): σ 9.25 (δ , $J = 7$ Hz, 1 H, H1), 8.5 (d, $J = 7$ Hz, 1 H), 8.1-6.9 (m, 5H + OH), 2.9 (t, $J = 4$ Hz, 2H, CH_2), 1.5-1.3 (m, 4H, 2 CH_2), 0.9 (t, 3 H, CH_3). Spectre de masse (ESI): 286 (M-HCl).

II) Effets pharmacologiques des composés de l'invention

Les effets pharmacologiques des composés de la famille des benzo[c]quinolizinium, activateurs de CFTR: le chlorure de 6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium (nom de référence: MPB-07) et de 5-butyl-6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium (nom de référence: MPB-91), ont été étudiés sur des anneaux d'aorte isolée de rat et d'artères mammaires humaines.

Les résultats montrent les faits suivants

(1)MPB-91 ($EC_{50} = 21 \mu M$) et MPB-07 ($EC_{50} = 134 \mu M$) ont un effet vasorelaxant dose-dépendant, réversible et lent, sur les deux préparations.

(2) Ces composés activent un transport anionique dans les cellules musculaires lisses. Le profil d'activation de ce transport (MPB-91, MPB-07) est similaire à celui rencontré dans les cellules épithéliales exprimant la protéine CFTR.

Effets vaso-dilatateur des composés de la famille benzo[c]quinolizinium.

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel biologique

Prélèvement et dissection de l'aorte de Rat

Les expérimentations sont réalisées sur l'aorte thoracique de rats mâles de souche Wistar de 200 à 250 g âgés de 7 à 8 semaines. Le rat est assommé puis placé en décubitus dorsal. Après thoracotomie, le segment d'aorte compris entre le

diaphragme et la crosse aortique est excisé. Le morceau d'aorte est immédiatement placé dans une solution physiologique tamponnée de type Krebs modifié. L'aorte est sectionnée en anneaux de 5 mm.

5 **Abrasion de l'endothélium**

Pour certaines préparations, l'endothélium est enlevé mécaniquement à l'aide d'une aiguille entourée de fil que l'on fait tourner dans l'anneau d'aorte. Ce procédé ne lèse pas les cellules musculaires lisses.

10 **B. Technique des organes isolés**

Montage dans la cuve à organes isolés

Les anneaux d'aorte, après dissection, sont suspendus entre deux crochets dont l'un est fixe et l'autre mobile. Ce montage est placé dans une cuve en Plexiglas (Emka Technologies), thermostatée à 37°C, contenant 5 ml de solution
15 physiologique oxygénée par un mélange gazeux (95% O₂ - 5% CO₂). L'enceinte thermostatée est alimentée par un bain-marie. Le crochet mobile est suspendu à un capteur relié à l'interface (transducteur mécanoélectrique). Cette interface est reliée d'une part à un amplificateur (amplification du signal) et d'autre part à un
20 ordinateur (visualisation et analyse du signal). Le programme IOX 1.565 permet le traitement et la visualisation des signaux sur l'écran d'ordinateur. Les programmes Data Analyst et Prism 3.0 permettent l'analyse des résultats.

Principe de fonctionnement

25 La force isométrique développée par les préparations artérielles est transformée en une différence de potentiel qui est amplifiée puis transcrite en un signal visualisé sur un écran d'ordinateur.

Méthodologie

30 Après le montage des anneaux d'aorte dans le dispositif expérimental, ceux-ci sont étirés à une tension basale de 2.5 g. Cette tension correspond au point optimum de leur relation tension/longueur. L'attente de l'état stable dans le milieu

physiologique de référence se réalise sur une période d'environ 1 heure avec un lavage toutes les 20 minutes. A la suite de cette période d'équilibration, les différentes expériences sont réalisées.

5 **Test de la fonction endothéliale**

Afin de s'affranchir des mécanismes de relaxation/contraction dus à l'endothélium, certaines préparations sont débarrassées de celui-ci par destruction mécanique. Pour s'assurer de la destruction effective de l'endothélium, un test cholinergique (ACh 10^{-4} M) est réalisé au terme de la première période
10 d'équilibration, sur des préparations précontracturées par une solution hyperpotassique (80 mM de KCl). Ce test est considéré valide si l'ajout d'ACh ne provoque pas de relaxation et que la préparation reste à l'état contractée.

Suite à ce test, les préparations subissent plusieurs lavages successifs afin de retrouver un état stable. Une fois l'état stable atteint, les différentes expériences
15 peuvent être réalisées. Les contractures dues aux solutions hyperpotassiques sont obtenues par remplacement total de la solution physiologique de référence par la solution hyperpotassique. L'administration des substances pharmacologiques se fait de façon cumulative et directement dans les cuves à organes isolés en prenant garde que le volume additionnel ne soit pas trop élevé. L'application de chaque
20 nouvelle concentration ne se fait qu'après stabilisation. Afin de rendre compte de l'état de réactivité de la préparation en fin de manipulation, un test hyperpotassique ou noradrénergique est effectué. Si la préparation réagit dans le sens d'une contracture, le test est validé.

25 **C. Les différentes solutions physiologiques et les substances pharmacologiques utilisées**

Solutions physiologiques

La composition de la solution physiologique de référence est une solution
30 de type Krebs modifié : NaCl : 120mM ; KCl : 4,7mM ; CaCl_2 : 2,5mM ; MgCl_2 : 1,2mM ; NaH_2PO_4 : 1,2mM ; NaHCO_3 : 15mM ; Hepes : 10mM ; Glucose : 11mM ; pH = 7,4. Des solutions hyperpotassiques contenant différentes

concentrations de KCl ont été préparées selon le même principe. Ces solutions sont utilisées pour provoquer une contracture de l'anneau d'aorte par dépolarisation des cellules musculaires lisses. La solution hyperpotassique majoritairement utilisée dans les expériences contient 80 mM de KCl.

5

Substances pharmacologiques

- MPB-07 (chlorure de 6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium)
- MPB-91 (chlorure de 5-butyl-6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium)
- Artérénol (norépinephrine, SIGMA, USA)
- 10 - ACh (acétylcholine, SIGMA, USA)
- L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester, SIGMA, USA)
- MPB-70 (10-chlorobenzo[c]quinolizine-6-one)
- Vérapamil (SIGMA, USA)

15

D. Les efflux d'iodure

La technique des efflux d'iodure, mise au point par Venglarick et al. (1990), permet la mesure des mouvements d'ions et est décrite en détail dans Dérand et al. (2001).

20

Méthodologie

Les anneaux d'aorte de taille équivalente, sont incubés dans 1 ml de solution de charge composée de solution physiologique de type Krebs modifié ou hyperpotassique (80 mM KCl) supplémentée de 1,5 µl/ml de Na ¹²⁵I et 0,1 µl/ml de KI. Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, 4 rinçages successifs de deux minutes
25 sont réalisés dans 1 ml de solution physiologique appropriée (solution Krebs normale ou hyperpotassique). Une cinétique d'efflux d'iodure des anneaux d'aorte est réalisée pendant 12 min. Après chaque minute, le contenu de chaque puits est prélevé et placé dans des tubes à hémolyse, et la radioactivité est comptée par un compteur gamma (Packard, Cobra II). A la 12^e minute, les anneaux d'aorte sont
30 solubilisés dans du Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS 0,1%) + NaOH (0,1M). Cette étape permet la récupération de la radioactivité résiduelle par destruction cellulaire.

Présentation des résultats

La radioactivité totale des cellules est calculée par l'addition des coups par minute (cpm) de chaque fraction collectée et des cpm de la fraction solubilisée (radioactivité résiduelle). Les courbes sont tracées en exprimant les efflux en pourcentage du contenu cellulaire accumulé dans le milieu en fonction du temps. Par exemple, la valeur attribuée au temps t_n , correspond à : $100 \times (\sum \text{cpm obtenus de } t_0 \text{ à } t_n) / \text{radioactivité totale}$. La vitesse instantanée de sortie est présentée selon la formule $\text{Ln}({}^{125}\text{It}_1 / {}^{125}\text{It}_2) / (t_1 - t_2)$, où t_1 et t_2 sont deux temps successifs et ${}^{125}\text{It}_1$ et ${}^{125}\text{It}_2$ sont les efflux mesurés aux temps t_1 et t_2 . Pour évaluer l'effet d'une substance, on détermine le rapport d'activation $r = \text{vitesse de sortie après stimulation} / \text{vitesse de sortie avant stimulation}$. Les résultats (moyenne \pm SEM) sont comparés à l'aide du test statistique de Student pour une valeur appariée.

15 **RESULTATS**

A. ORGANES ISOLES

1 / Expériences témoins

20

▪ Contracture hyperpotassique et contracture par l'artérénol (figure 1A B)

Après un état de stabilité des anneaux d'aorte en solution normale de type Krebs, la totalité de la solution est remplacée par une solution hyperpotassique contenant 80 mM de KCl. Cette solution a pour effet de contracter les anneaux d'aorte par dépolarisation des cellules musculaires lisses. La figure 1A montre que la contracture obtenue en milieu hyperpotassique est stable dans le temps. Elle est prise comme contrôle (100% de la contracture) dans les différentes expériences réalisées. La contracture par l'artérénol (10^{-4} M) se fait par ajout directement dans la cuve contenant la solution normale de type Krebs. Le mécanisme qui conduit à la contracture de l'aorte est différent. L'artérénol se fixe sur un récepteur

adrénergique de type alpha 1 intégré à la membrane des cellules musculaires lisses. C'est la voie classique via le DAG et l'IP₃ qui permet la contracture.

▪ **Validation de la technique de désendothélisation**

5 Afin de vérifier la présence ou non de l'endothélium, le test cholinergique est utilisé. Après contracture de l'anneau d'aorte en milieu hyperpotassique (80 mM de KCl), de l'ACh (10⁻⁴ M) est ajouté dans la cuve. Les résultats montrent que les anneaux d'aorte *sans endothélium* restent contracté alors que les anneaux d'aorte *avec endothélium* se relaxent (environ 40% de relaxation). Dans cette
10 étude ce test a été validé.

▪ **Effets de différents solvants, solutions et substances**

Avant de commencer les expérimentations, différents tests témoins de diverses substances ont été pratiqués afin d'anticiper leurs effets éventuels sur les
15 préparations. L'ajout d'eau et de DMSO (diméthylsulfoxyde), solvants principaux de la majorité des substances injectées aux préparations, n'ont aucun effet sur les anneaux d'aorte, que ceux-ci soient en solution Krebs normale ou en solution hyperpotassique.

20 ▪ **Contrôle du pH**

Les solutions Krebs normale ou hyperpotassique ont un pH de 7,4. Sur une expérience de 7 heures, ce pH ne présente aucune dérive, dans les deux conditions. Après ajout de MPB-07 ou autres substances pharmacologiques utilisées, le pH ne présente aucune dérive dans le temps.

25 ▪ **Dérive de la contracture des anneaux d'aorte dans le temps**

Les anneaux d'aorte précontracturés soit par une solution hyperpotassique soit par de l'artérénol, présentent une contracture stable dans le temps, une heure environ après l'état stable de contracture acquis.

2/ Effet du MPB-07 sur des anneaux d'aorte précontracturés en solution hyperpotassique

▪ Anneaux d'aorte avec endothélium (figure 2 A ; figure 3A)

5 Le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte avec endothélium comme le montre la figure 2A. Les résultats présentés figure 3A sont en pourcentage de la contracture maximale obtenue en solution hyperpotassique. La figure 3A montre que sur des anneaux d'aorte avec endothélium, le MPB-07 présente une $EC_{50} = 132,4 \pm 0,02 \mu M$ (n=14). La
10 relaxation est effective à partir de $80 \mu M$ ($24 \pm 1,6 \%$ de relaxation, n=14) et atteint $96 \pm 1,75\%$ (n=14) pour $500 \mu M$.

▪ Anneaux d'aorte sans endothélium (figure 3B)

15 Le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte sans endothélium. Cette molécule a donc une action endothélium indépendante. Les résultats sont présentés en pourcentage de la contracture maximale obtenue en solution hyperpotassique. Sur les anneaux d'aorte sans endothélium, la figure 3B montre que le MPB-07 présente un $EC_{50} = 92,90 \pm 0,02 \mu M$ (n=7). La relaxation est probante à partir de $80 \mu M$ ($37 \pm 5,6\%$ de relaxation, n=7) et atteint 99 ± 1
20 % (n=7) à $250 \mu M$. En comparaison avec le résultat précédent, le MPB-07 semble plus efficace sur les anneaux d'aorte *sans endothélium* que sur les anneaux d'aorte *avec endothélium*, les deux EC_{50} sont significativement différents (test de Student, $p < 0,01$). L'absence de l'endothélium joue donc un rôle sur l'effet relaxant provoqué par le MPB-07.

25

▪ Anneaux d'aorte avec endothélium + L-NAME (figure 2B ; figure 3C)

La L-NAME a été utilisée afin d'inhiber les mécanismes de régulation par l'endothélium sur les cellules musculaires lisses et dans le but de mimer une absence de l'endothélium. Cette molécule est un inhibiteur de la NO (nitric oxyde)
30 synthase présente dans les cellules endothéliales. La L-NAME ($10^{-4} M$) est ajoutée dans la solution hyperpotassique 30 minutes avant la gamme de MPB-07. Le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte avec

endothélium traités par la L-NAME comme le montre la figure 2B. Les résultats (figure 3C) sont présentés en pourcentage de la contracture maximale obtenue en solution hyperpotassique après l'ajout de la L-NAME. Le MPB-07 présente un $EC_{50} = 51,80 \pm 0,008 \mu M$ ($n=8$). La relaxation se prononce à partir de $40 \mu M$ ($33 \pm 6,15\%$ de relaxation, $n=8$) et atteint $98 \pm 1,3\%$ pour $160 \mu M$. En comparaison avec les résultats précédents, la présence de L-NAME potentialise l'effet vasorelaxant du MPB-07.

▪ **Anneaux d'aorte sans endothélium en présence de L-NAME** (figure 3D)

L'effet du MPB-07 a été testé sur des anneaux d'aorte sans endothélium et en présence de L-NAME pour bloquer la voie de régulation par le NO. Dans cette situation, le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte avec un $EC_{50} = 55,1 \pm 0,2 \mu M$ ($n=7$). Il est à noter que les courbes « avec endothélium + L-NAME » et « sans endothélium + L-NAME » sont comparables. Les figures 5A et 5B présentent les différences statistiques entre la courbe « avec endothélium » et les courbes « sans endothélium » et « avec endothélium + L-NAME ».

3/ Réversibilité de l'effet MPB-07 (figure 4A)

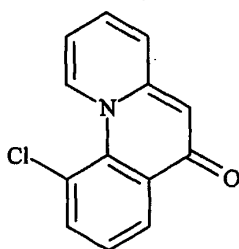
Nous venons de montrer que le MPB-07 induisait une vasorelaxation des anneaux d'aorte précontractés en solution hyperpotassique. Cet effet est réversible comme le montre la figure 4A. Dans cette expérience l'ajout de MPB-07 en dose unique ($135 \mu M$) provoque une relaxation des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés en milieu hyperpotassique. Après un état stable de relaxation, les anneaux sont lavés en milieu physiologique normal afin de revenir à l'état basal de contracture, puis contracté de nouveau en milieu hyperpotassique. Les résultats ($n=4$) montrent, une réactivité positive des anneaux d'aorte, après une dose unique de MPB-07, ceux-ci retrouvant leur contracture hyperpotassique initiale. Ces résultats montrent la réversibilité de l'effet relaxant du MPB-07.

4/ Effet du MPB-07 sur des anneaux d'aorte précontractés par de l'artérénol

La figure 4B montre que l'ajout de MPB-07 (10 μ M) provoque une relaxation des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés par de l'artérénol (10⁻⁴M). Les résultats montrent 90 \pm 9% de relaxation au bout de 2h30. Des oscillations rapides de contracture sont observables. Ces variations transitoires présentent une amplitude qui augmente en fonction du temps. L'ajout de vérapamil (inhibiteur canaux Ca_L, 200 μ M) stoppe ces variations.

5/ Comparaison de l'effet du MPB-07 avec l'effet du MPB-91 et MPB-70 (figure 5C et 6)

Le MPB-07 et MPB-91 sont des activateurs de CFTR. Il nous est paru intéressant de comparer leur effets avec le MPB-70 un analogue inactif sur CFTR des cellules épithéliales, et dont la formule est la suivante



MPB-70

De 10 μ M à 80 μ M l'effet des 2 molécules est semblable, les résultats ne présentent pas de différence statistiquement significative. A 160 μ M, le MPB-70 relaxe les anneaux d'aorte (n = 7) de 27 % contre 64 % par le MPB-07 (n = 14) : cette différence est significative (***) ; p<0,001). A 250 μ M, le MPB-70 provoque 42 % de relaxation des anneaux d'aorte alors que le MPB-07 à cette même concentration provoque 88 % de relaxation (différence statistiquement significative, p<0,001). A 500 μ M, le MPB-07 relaxe à 100% les anneaux d'aorte alors que le pourcentage de relaxation par le MPB-70 ne varie peu (46 %) et reste le même pour des concentrations supérieures. La comparaison des courbes doses/réponses présentée figure 6 montre que le MPB-91 (EC₅₀ = 21 μ M) est plus efficace que le MPB-07 (EC₅₀ = 133 μ M).

6/ Conclusion

Cette étude montre que :

➤ Le MPB-07 et le MPB-91 ont un effet vasorelaxant dose-dépendant, réversible et lent, sur les anneaux d'aorte précontracturés.

5 ➤ L'inhibition de la voie de la NO-synthase par la L-NAME renforce cet effet pharmacologique.

➤ L'ordre d'efficacité des composés est MPB-91>MPB-07>>MPB-70 sur ces préparations suit celui observé sur le CFTR épithélial humain.

10 ➤

B. LES EFFLUX D'IODURE

La technique des efflux d'iodure a été utilisée pour caractériser les transports anioniques et leur mode de stimulation par le MPB-07. Cette technique permet de tracer un transport ionique dans une cellule chargée au préalable avec le radiotraceur correspondant. Nous avons adapté cette technique utilisée en routine au laboratoire pour l'étude sur des anneaux d'aorte.

15 Nous avons d'abord étudié les cinétiques de sortie de ^{125}I des cellules musculaires lisses des anneaux d'aorte (dépourvus d'endothélium) à l'état basal, c'est-à-dire en absence de stimulation. Ces expériences ont été réalisées dans deux conditions : en milieu physiologique normal et en milieu hyperpotassique. Cette étude permet de comparer les résultats obtenus après stimulation des anneaux d'aorte. Les résultats montrent que la sortie d'iodure s'effectue régulièrement en fonction du temps. L'efflux basal correspond à la diffusion passive de la charge radioactive en dehors des cellules. Ces expériences montrent que l'absence de vitesse de sortie correspond à l'absence de stimulation d'un transport anionique.

30 1/ Effet du MPB-07 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte sans endothélium en milieu hyperpotassique (80 mM KCl) (figure 7A et 8A)

Dans une même situation expérimentale que celle utilisée en organes isolés l'ajout de MPB-07 provoque une augmentation de l'efflux d'iodure comme

le montre la figure 7A. La vitesse de sortie augmente de $0,053 \pm 0,005$ à l'état basal à $0,076 \pm 0,008$ (augmentation de 0,023) une minute après l'addition de MPB-07, puis $0,099 \pm 0,013$ (soit une augmentation de 0,046) 2 minutes après l'addition de la molécule (résultats de $n = 8$ expériences). Ces résultats montrent que le MPB-07 active un transport anionique dans ces conditions. La figure 8A montre les différences statistiques entre la vitesse de sortie avant et après stimulation par le MPB-07.

2/ Effet du MPB-07 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte avec endothélium traités à la L-NAME, en milieu hyperpotassique (figure 7B et 8B)

L'ajout de MPB-07 provoque une augmentation de l'efflux (figure 7B). En présence de

L-NAME (10^{-4} M) cette augmentation est plus élevée que dans l'expérience précédente. En effet, la vitesse de sortie passe de 0,059 à l'état basal à $0,103 \pm 0,017$ (augmentation de 0,044) une minute après l'addition de MPB-07, puis à $0,110 \pm 0,015$ (augmentation de 0,051) 2 minutes après l'ajout de MPB-07, pour atteindre $0,119 \pm 0,011$ (augmentation de 0,060) 3 minutes après l'addition de la molécule (résultats de $n = 4$ expériences). L'augmentation de vitesse de sortie est statistiquement significative par rapport à la valeur basale (figure 8B). Ces résultats montrent que le transport anionique activé par le MPB-07 (250 μ M) est potentialisé par la présence de L-NAME. L'inhibition de la NO synthase potentialise l'activation d'un transport anionique par le MPB-07. Ce résultat conforte les résultats obtenus en organes isolés.

25

3/ Effet du MPB-70 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte sans endothélium, en milieu hyperpotassique (figure 7C et 8C)

Le MPB-70 est une molécule de la même famille que le MPB-07, mais inactive sur le canal CFTR. Comme en organes isolés, le MPB-70 a été testé en efflux de radiotraceurs. Sur les anneaux d'aorte, l'addition de MPB-70 ne provoque pas d'augmentation de la vitesse de sortie. La vitesse de sortie passe de

30

0,056 \pm 0,002 à 0,053 \pm 0,003 une minute après l'addition de MPB-70. Cette vitesse n'atteint que 0,055 \pm 0,005, 2 minutes après l'ajout de la molécule.

4/ Effet du MPB-07 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte sans endothélium en milieu physiologique normal (figure 7D et 8D)

La stimulation par le MPB-07 entraîne une faible activation de l'efflux d'iodure. Ceci se traduit par une augmentation de la vitesse de sortie qui passe de 0,044 \pm 0,009 à 0,076 \pm 0,016 sur n = 3 expériences. Statistiquement cette augmentation est non significative (ns) comme le montre la figure 8D.

5/ Conclusion

Le MPB-07 active un transport anionique dans les cellules musculaires lisses, potentialisé par la L-NAME. Le profil d'activation de ce transport (MPB-07>>>MPB-70) est similaire à celui rencontré dans les cellules épithéliales exprimant le CFTR humain. Des effets similaires ont été observé avec le composé MPB-91.

C. Démonstration de l'expression de la protéine CFTR dans la cellule musculaire lisse de l'aorte de rat et de souris.

CFTR est détectée au niveau de son ARN messenger et au niveau protéique dans les muscles lisses. Comme témoin négatif les inventeurs ont utilisé le muscle squelettique de rat au niveau duquel ni le messenger ni la protéine ne sont présents. CFTR est détectable dans le muscle lisse par immunoprécipitation et phosphorylation *in vitro* par la protéine kinase A. La pharmacologie de CFTR a été étudiée par efflux d'iodure dans la cellule musculaire fraîchement dissociée à partir d'aorte de rat. Il est démontré par les inventeurs que des agonistes de la voie de l'AMPc comme la forskoline, l'IBMX, le cpt-AMPc et le neuropeptide VIP activent un efflux iodure dont la signature pharmacologique est celle du CFTR. Son profil d'inhibition est similaire à celui du CFTR épithélial (sensibilité au glibenclamide et au DPC mais pas au Calixarene). Dans des expériences sur tissus de rat et de souris *Cfr*^{+/+}, l'activation physiologique de CFTR par le VIP et

pharmacologique par les composés MPB-07 et MPB-91 conduit à une relaxation de l'aorte précontractée. Chez des souris invalidées pour le gène CFTR (= souris Cfr^{-/-}, souris B6 ; 129-CFTR^{tm1Unc} en provenance du centre d'élevage CNRS CDTA d'Orléans), cet effet est très largement réduit. De plus, une contraction plus importante est observée chez les animaux KO en réponse aux agents constricteurs. La figure 9 présente ces résultats.

Ces résultats démontrent (1) que CFTR est exprimé et fonctionnel dans le muscle lisse, (2) que son profil pharmacologique tant pour l'activation que pour l'inhibition est très similaire à celui du CFTR épithélial, (3) que son absence dans la souris KO conduit à des troubles de tension vasculaire très proches de ceux rencontrés dans l'hypertension, (4) que les benzo[c]quinoliziniums représente une nouvelle famille de composés anti-hypertenseurs, ouvrant ainsi une nouvelle voie de recherche pharmacologique et de traitement potentiel des maladies liées à l'hypertension. Ces résultats démontrent en outre qu'une molécule qui se révélerait être activatrice de CFTR, peut agir comme un vasorelaxant et un broncho-dilatateur potentiel.

Légende des figures

Figure 1 : A. Tracé représentatif d'une contraction d'anneaux d'aorte par une solution hyperpotassique

B. Tracé représentatif d'une contraction d'anneaux d'aorte par de l'artérol (10⁻⁴ M)

Figure 2 : Tracés représentatifs d'une gamme de MPB-07 : **A.** sur des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés en solution hyperpotassique ; **B.** sur des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés en solution hyperpotassique, en présence de L-NAME (10⁻⁴M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07.

Figure 3 : Courbes représentant le pourcentage de contraction des anneaux d'aorte en fonction du logarithme décimal de la concentration en MPB-07 (en M).

La gamme de MPB-07 (10, 20, 40, 80, 160, 250, 500 et 1000 μ M) est réalisée sur des anneaux d'aorte précontractés en solution hyperpotassique (80 mM de KCl) :

A. avec endothélium, moyenne \pm SEM de $n = 14$ expériences réalisées sur 4 rats ;

B. sans endothélium, moyenne \pm SEM de $n = 7$ expériences réalisées sur 2 rats ;

5 C. avec endothélium, en présence de L-NAME (10^{-4} M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07, moyenne \pm SEM de $n = 8$ expériences réalisées sur 2 rats ; D. sans endothélium, en présence de L-NAME (10^{-4} M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07, moyenne \pm SEM de $n = 7$ expériences réalisées sur 2 rats. Le pourcentage de contraction est calculé par rapport à la valeur de tension maximale obtenue en solution hyperpotassique. Les résultats sont normalisés par rapport à cette valeur.

Figure 4 : A. Tracé représentatif de la réversibilité de l'effet du MPB-07 (135 μ M) sur des anneaux d'aorte avec endothélium B. Tracé représentatif de l'effet du MPB-07 (à 10 μ M) sur des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés par de l'artérénol (10^{-4} M).

Figure 5 : Comparaison statistique des doses / réponses du MPB-07 entre des anneaux d'aorte : A. avec endothélium et sans endothélium B. avec endothélium et avec endothélium en présence de L-NAME (10^{-4} M) ; C. Comparaison des doses / réponses du MPB-07 et du MPB-70 sur des anneaux d'aorte avec endothélium. Les résultats sont présentés en pourcentage de contraction en fonction du logarithme décimal de la concentration en MPB-07. Les valeurs de contraction pour chaque concentration sont comparées statistiquement, par le test de Student.

ns : différence non significative entre les 2 valeurs comparées

* : différence significative entre les 2 valeurs comparées, $p < 0,05$

** : différence significative entre les 2 valeurs comparées, $p < 0,01$

Figure 6 : Comparaison des courbes doses / réponses du MPB-07 et MPB-91: Les résultats sont présentés en pourcentage de contraction en fonction du logarithme décimal de la concentration en MPB-07.

Figure 7 : Résultats représentatifs des efflux d'iodure sur des anneaux d'aorte sans endothélium : **A.** en présence de MPB-07 (250 μ M) en milieu hyperpotassique ; **B.** en présence de MPB-07 (250 μ M) en milieu hyperpotassique et L-NAME (10^{-4} M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07 ; **C.** en présence de MPB-70 (250 μ M) en milieu hyperpotassique ; **D.** en présence de MPB-07 (250 μ M) en milieu physiologique normal.

Le MPB-07 ou MPB-70 est ajouté au bout de 4 min. La valeur au temps 4 min est prise comme valeur contrôle. La vitesse de sortie est représentée en fonction du temps.

Figure 8 : Représentation du rapport de la valeur de vitesse de sortie obtenue après différents temps de stimulation et de la valeur de vitesse de sortie avant stimulation.

A. stimulation par MPB-07 en milieu hyperpotassique, moyenne \pm SEM de $n = 8$ expériences; **B.** stimulation par MPB-07 en milieu hyperpotassique, en présence de L-NAME (10^{-4} M) 30 min avant l'ajout, moyenne \pm SEM de $n = 4$ expériences ; **C.** stimulation par MPB-70, en milieu hyperpotassique, moyenne \pm SEM de $n = 4$ expériences ; **D.** stimulation par MPB-07 en milieu physiologique normal, moyenne \pm SEM de $n = 3$ expériences. Les résultats sont comparés statistiquement (t test Student) par rapport à la valeur basale.

ns : différence non significative par rapport à la valeur basale

* : différence significative par rapport à la valeur basale, $p < 0,05$

** : différence significative par rapport à la valeur basale, $p < 0,01$

Figure 9 : Mise en évidence de l'existence d'un tonus vasculaire anormal et d'une vasorelaxation altérée chez la souris invalidée pour le gène CFTR (souris $Cfr^{-/-}$)

a, tracés montrant la vasorelaxation induite par le neuropeptide VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) d'aortes sans endothélium de souris $Cfr^{+/+}$ (gauche) et $Cfr^{-/-}$ (droite). Les anneaux d'aortes sont contractés réversiblement par une solution hyperpotassique (solution 80 mM K^+) puis l'effet de 300 nM VIP est

mesuré. L'absence de l'endothélium est vérifié par l'addition d'acetylcholine (ACh, 10^{-5} M).

b, Histogrammes des tensions moyennes mesurées en réponse à une solution de 80 mM K^{+} pour des souris $Cfr^{+/+}$ and $Cfr^{-/-}$ avec (gauche) et sans (droit) endothélium.

C, Histogrammes des moyennes de % de vasorelaxation induit par 300 nM VIP après constriction des anneaux d'aortes par 80 mM K^{+} pour des souris $Cfr^{+/+}$ et $Cfr^{-/-}$.

d, Courbes concentration-réponse pour le composé MPB-07 montrant une vasorelaxation d'anneaux d'aortes contractés par 80 mM K^{+} chez des souris $Cfr^{+/+}$ ($IC_{50} + 37 \pm 1.17 \mu M$, $n=6$). Cet effet est absent chez des souris $Cfr^{-/-}$ ($n=6$).
Moyenne \pm SEM * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Bibliographie

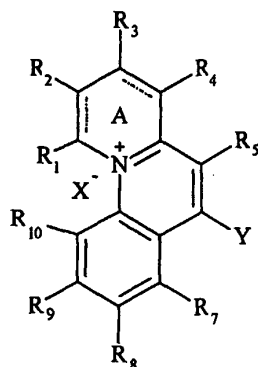
DORMER, R.L., DERAND, R., MCNEILLY, C.M., METTEY, Y., BULTEAU-PIGNOUX, L., METAYE, T., VIERFOND, J.M., GRAY, M.A., GALIETTA, L.J., MORRIS, M.R., PEREIRA, M.M., DOULL, I.J., BECQ, F. & MCPHERSON, M.A. (2001). Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. In *J Cell Sci.* pp. 4073-81.

BECQ, F., METTEY, Y., GRAY, M.A., GALIETTA, L.J., DORMER, R.L., MERTEN, M., METAYE, T., CHAPPE, V., MARVINGT-MOUNIR, C., ZEGARRA-MORAN, O., TARRAN, R., BULTEAU, L., DERAND, R., PEREIRA, M.M., MCPHERSON, M.A., ROGIER, C., JOFFRE, M., ARGENT, B.E., SARROUILHE, D., KAMMOUNI, W., FIGARELLA, C., VERRIER, B., GOLA, M. & VIERFOND, J.M. (1999). Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem*, **274**, 27415-25.

- DERAND, R., BULTEAU-PIGNOUX, L., METTEY, Y., ZEGARRA-MORAN, O., HOWELL, L.D., RANDAK, C., GALIETTA, L.J., COHN, J.A., NOREZ, C., ROMIO, L., VIERFOND, J.M., JOFFRE, M. & BECQ, F.
5 (2001). Activation of G551D CFTR channel with MPB-91: regulation by ATPase activity and phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C1657-66.
- VENGLARIK, C.J., BRIDGES, R.J. & FRIZZELL, R.A. (1990). A simple
10 assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am J Physiol*, **259**, C358-64.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de dérivés de formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

- l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

- R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₇, R₈, R₉ et R₁₀, représentent, indépendamment les uns des autres :

. un atome d'hydrogène, ou

. un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, ou de brome, ou de fluor, ou

. un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

. un cycle aromatique ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué

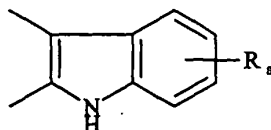
notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine (primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-OR_a$, R_a représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-NR_bR_c$, R_b et R_c , indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R_1 et R_2 , et/ou R_3 et R_4 , et/ou R_4 et R_5 , et/ou R_7 et R_8 , et/ou R_8 et R_9 , et/ou R_9 et R_{10} , ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_2 , et/ou R_2 en association avec R_3 , et/ou R_3 en association avec R_4 , et/ou R_4 en association avec R_5 , et/ou R_7 en association avec R_8 , et/ou R_8 en association avec R_9 , et/ou R_9 en association avec R_{10} , forment respectivement avec C_1 et C_2 , ou avec C_2 et C_3 , ou avec C_3 et C_4 , ou avec C_4 , C_{4a} et C_5 , ou avec C_7 et C_8 , ou avec C_8 et C_9 , ou avec C_9 et C_{10} , un cycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

. lorsque R_3 et R_4 ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_3 en association avec R_4 forment un groupe indole de formule



dans laquelle R_a est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

. un groupe $-OR_d$, R_d représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant
5 tels que définis ci-dessus, ou

. un groupe $-NR_eR_f$, R_e et R_f indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,
10

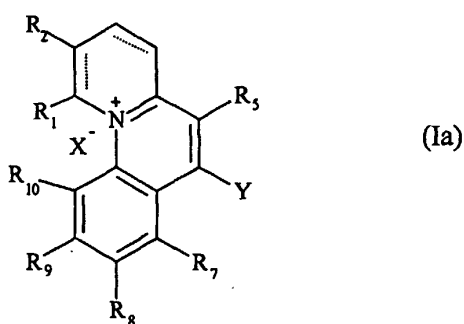
. étant entendu que lorsque R_d , ou l'un au moins de R_e ou de R_f ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_d , ou l'un au moins de R_e ou de R_f , en association avec R_5 , ou en association avec R_7 , forment respectivement avec C_5 et C_6 , ou avec C_6 , C_{6a} et
15 C_7 , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

- X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus, étant entendu que lorsque R_1 et R_{10} ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes
25 ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R_1 en association avec R_{10} forment avec C_1 , l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C_{11} , et C_{10} , un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes
30 ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les

pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

2. Utilisation selon la revendication 1, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivante :



dans laquelle :

- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- R₅ représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle, ou un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle,

- Y représente un groupe -OH, -SH, -NH₂, ou -NHCOCH₃,

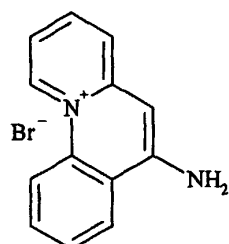
- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

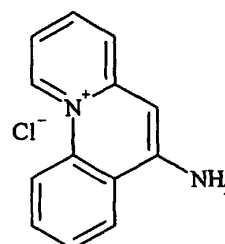
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) dans laquelle Y représente un groupe -NH_2 , ou -NHCOCH_3 .

4. Utilisation selon la revendication 3, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

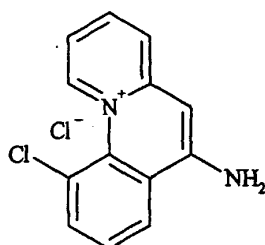
composé 13 (MPB-01)



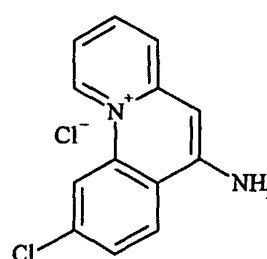
composé 11 (MPB-26)



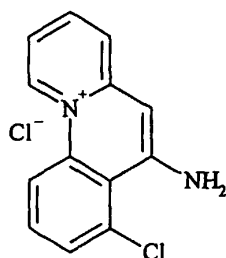
composé 14 (MPB-02)



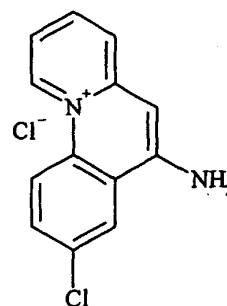
composé 15 (MPB-03)



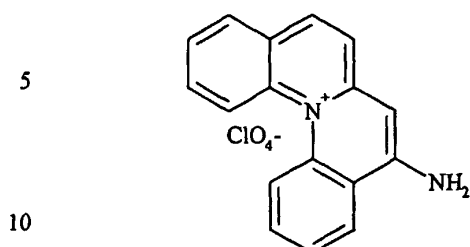
composé 16



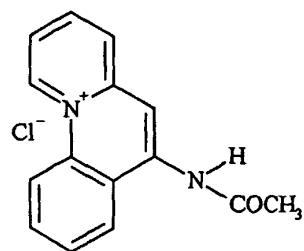
composé 17



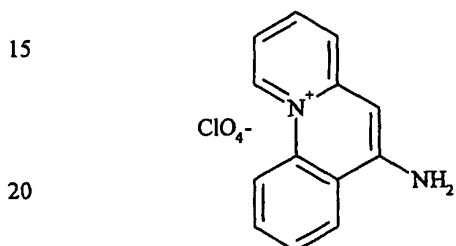
composé 22



composé 23



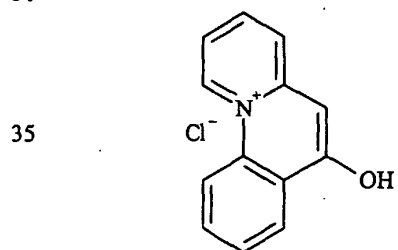
composé 24



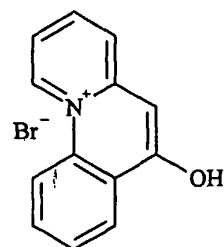
25 5. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) dans laquelle Y représente OH.

6. Utilisation selon la revendication 5, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) choisis parmi les suivants :

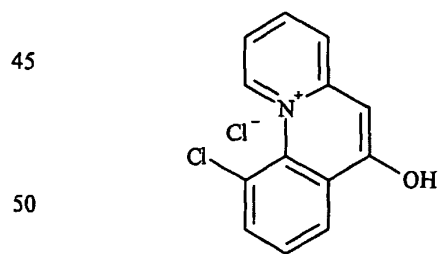
composé 12 (MPB-05)



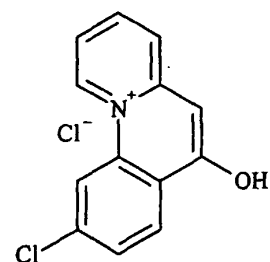
composé 18 (MPB-06)



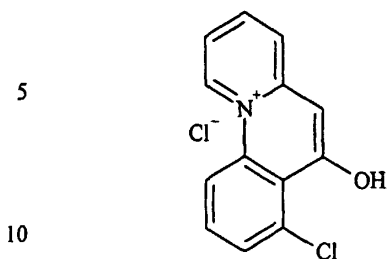
composé 19 (MPB-07)



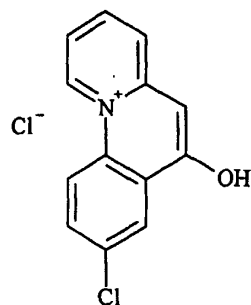
composé 20 (MPB-08)



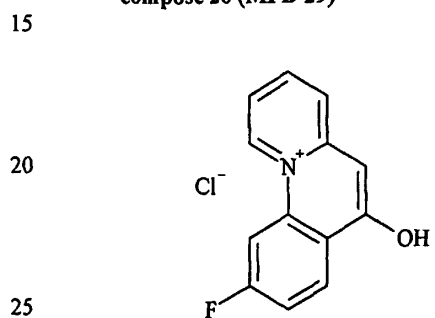
composé 21 (MPB-27)



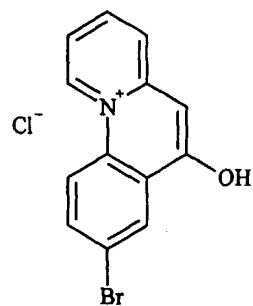
composé 25 (MPB-30)



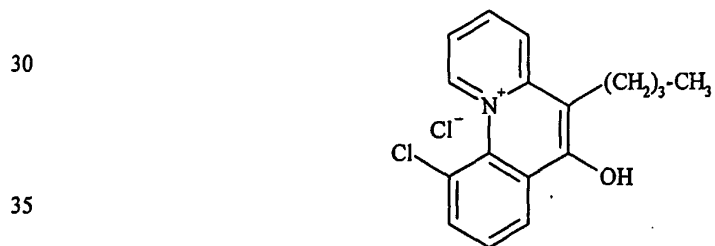
composé 26 (MPB-29)



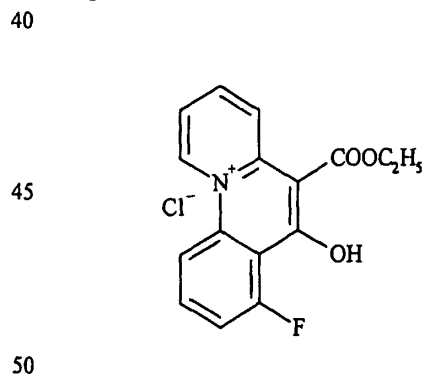
composé 27 (MPB-32)



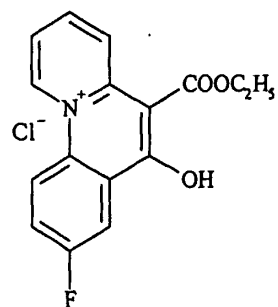
composé MPB-91



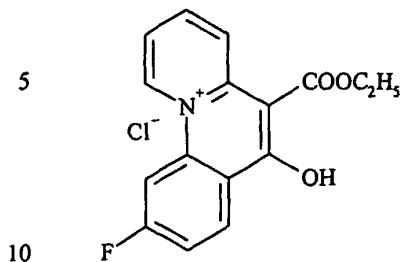
composé MPB 73



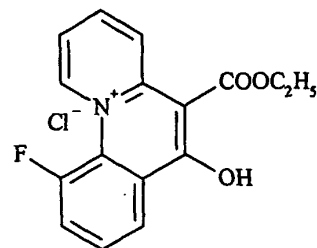
composé MPB 75



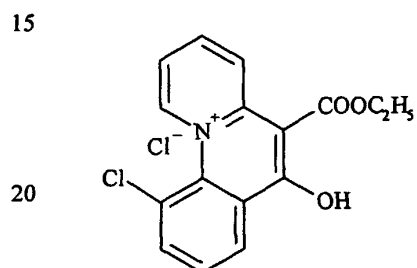
composé MPB 86



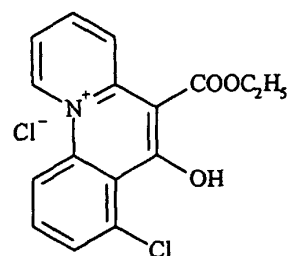
composé MPB 77



composé MPB 87



composé MPB 88



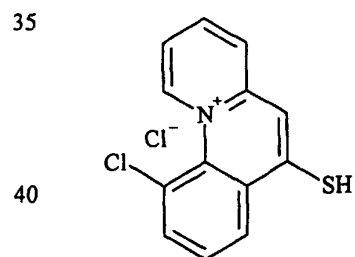
25

7. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) dans laquelle Y représente SH.

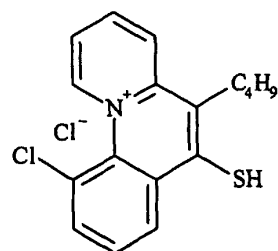
30

8. Utilisation selon la revendication 7, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) choisis parmi les suivants :

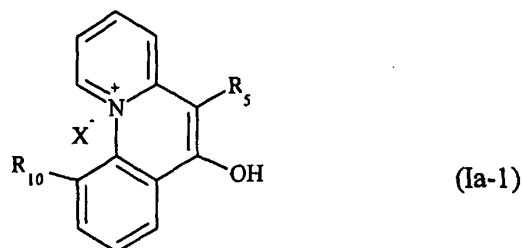
composé MPB 102



composé MPB 103



9. Utilisation selon la revendication 5, de dérivés de formule générale (Ia-1) suivante :



10 dans laquelle :

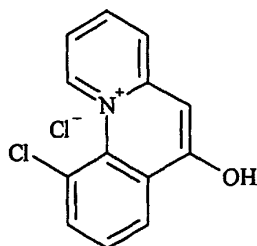
- R₅ représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,

- R₁₀ représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO₄⁻.

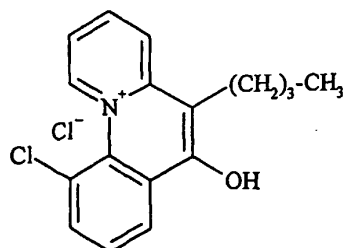
10 10. Utilisation selon la revendication 9, du dérivé MPB-07 de formule suivante :

composé 19 (MPB-07)

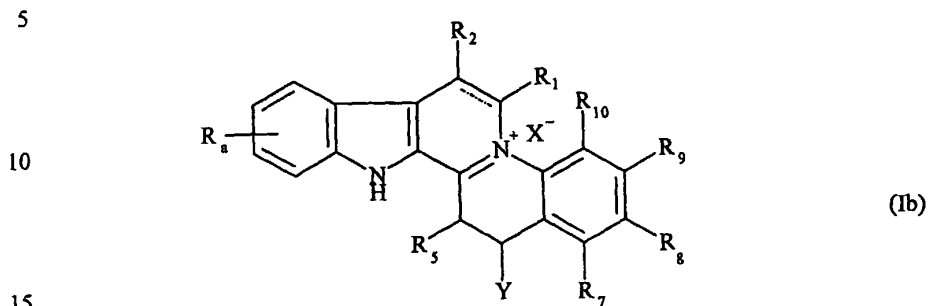


11. Utilisation selon la revendication 9, du dérivé MPB-91 de formule suivante :

35 composé MPB-91



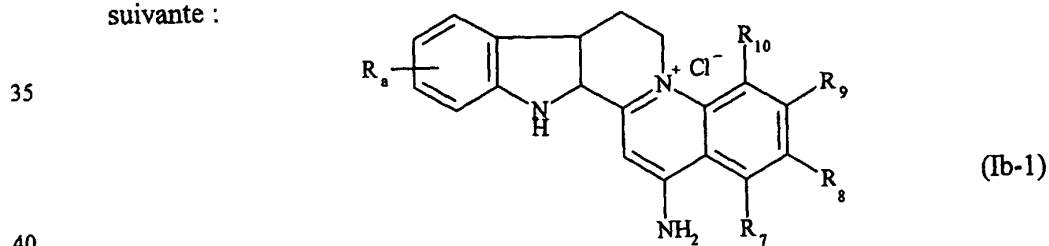
12. Utilisation selon la revendication 1, de dérivés de formule générale (Ib) suivante :



20 dans laquelle R_a , R_1 , R_2 , R_5 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , X et Y sont tels que définis dans la revendication 1, et notamment les composés de formule (Ib) dans laquelle:

- R_a représente un atome d'hydrogène,
 - R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R_1 et R_2 ,
 - R_5 représente un atome d'hydrogène,
 - 25 - R_7 , R_8 , R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R_7 , R_8 , R_9 ou R_{10} représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
 - Y représente $-NH_2$,
 - X représente un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.
- 30

13. Utilisation selon la revendication 10, de dérivés de formule (Ib-1) suivante :



et plus particulièrement les composés de formule (Ib-1) suivants :

- composé G : $R_7 = Cl, R_8 = R_9 = R_{10} = H$,
- composé H : $R_7 = R_8 = R_9 = R_{10} = H$,
- composé I : $R_8 = Cl, R_7 = R_9 = R_{10} = H$,
- 5 - composé J : $R_9 = Cl, R_7 = R_8 = R_{10} = H$,
- composé K : $R_{10} = Cl, R_7 = R_8 = R_9 = H$,
- composé L : $R_9 = Br, R_7 = R_8 = R_{10} = H$.

10 14. Composés de formule (I) telle que définie dans la revendication 1 dans laquelle R_5 représente un ester de formule $COOR'$ dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle.

15 15. Composés selon la revendication 14, de formule (Ia) telle que définie dans la revendication 2, dans laquelle :

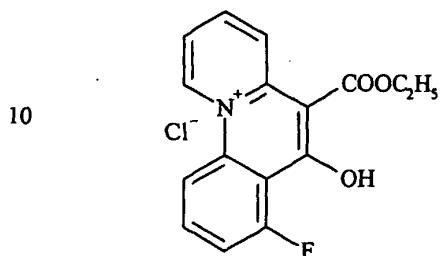
- R_1 et R_2 représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C_1 et C_2 un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
- R_5 représente un ester de formule $COOR'$ dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un
20 groupe éthyle,
- Y représente un groupe $-OH$, $-SH$, $-NH_2$, ou $-NHCOCH_3$,
- R_7, R_8, R_9 et R_{10} représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R_7, R_8, R_9 ou R_{10} , représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- 25 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br^- , ou de chlore Cl^- , ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

30 16. Composés selon la revendication 14 ou 15, de formule (Ia) dans laquelle R_5 représente un ester de formule $COOR'$ dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle, et Y représente un groupe $-OH$.

17. Composés selon l'une des revendications 14 à 16, de formules suivantes:

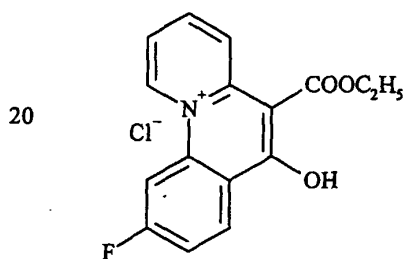
composé MPB 73

5

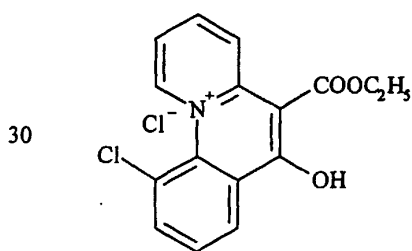


15

composé MPB 86



25 composé MPB 87



35

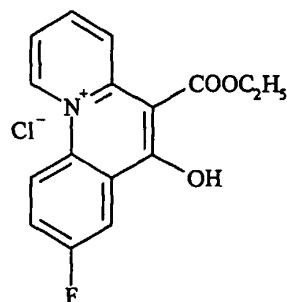
18. Composés de formule (I) telle que définie dans la revendication 1 dans laquelle Y représente SH.

19. Composés selon la revendication 18, de formule (Ia) telle que définie dans la revendication 2, dans laquelle :

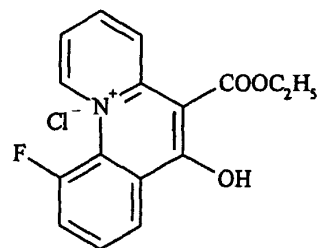
40

- R₁ et R₂ représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C₁ et C₂ un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

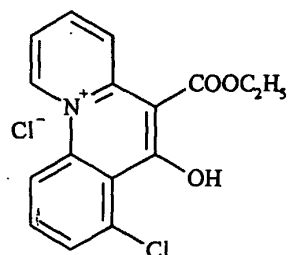
composé MPB 75



composé MPB 77



composé MPB 88



- R₅ représente - R₅ représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,

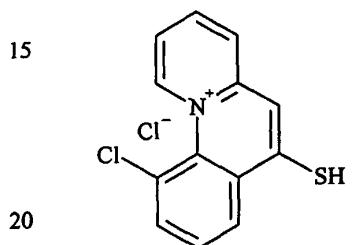
- Y représente un groupe -SH,

- R₇, R₈, R₉ et R₁₀ représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R₇, R₈, R₉ ou R₁₀, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

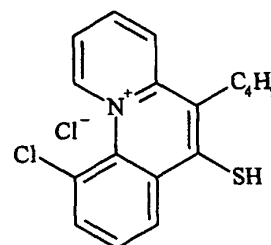
- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br⁻, ou de chlore Cl⁻, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

20. Composés selon la revendication 18 ou 19, de formules suivantes:

composé MPB 102



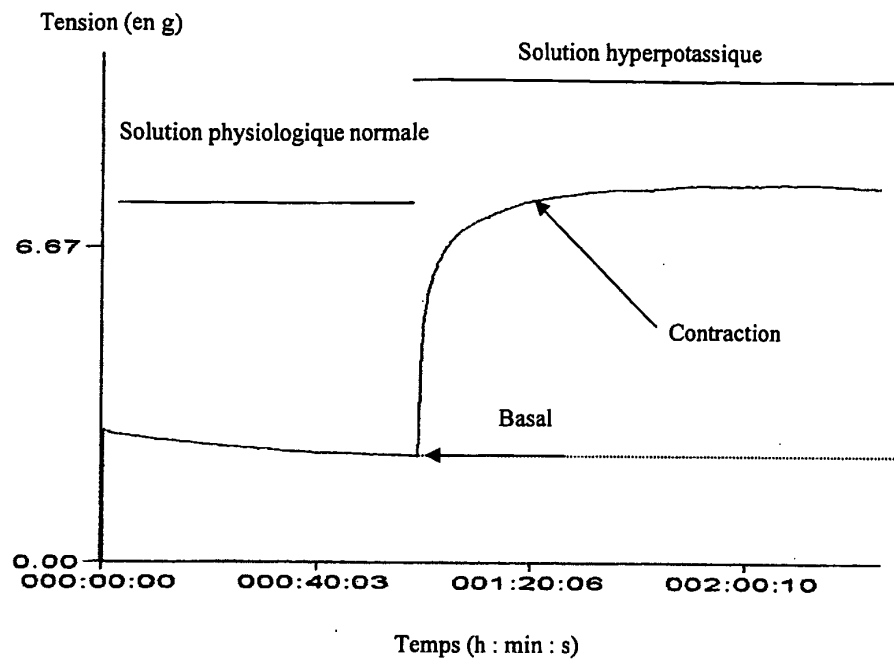
composé MPB 103



21. Compositions pharmaceutiques comprenant au moins un composé défini dans l'une des revendications 14 à 20, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

A.

1/9



B.

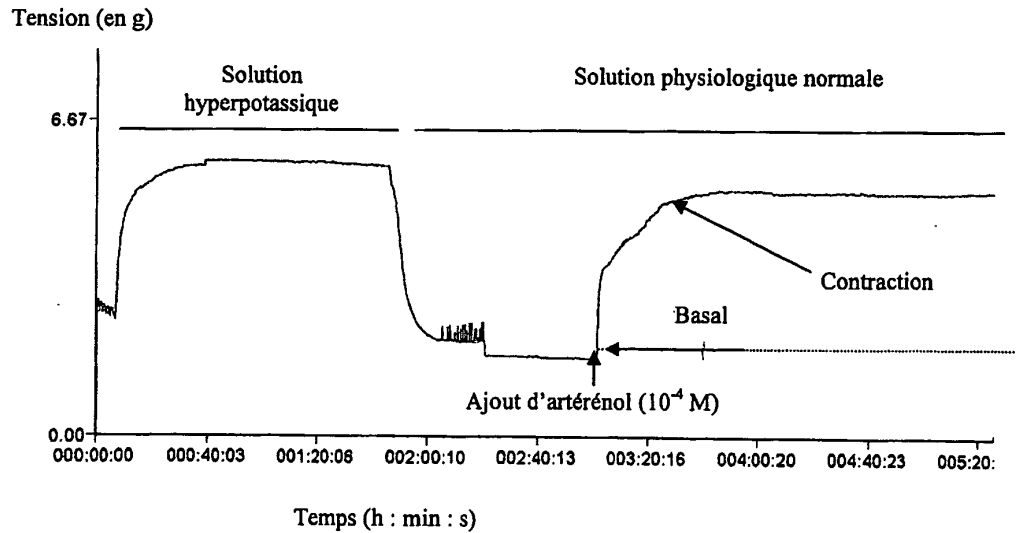
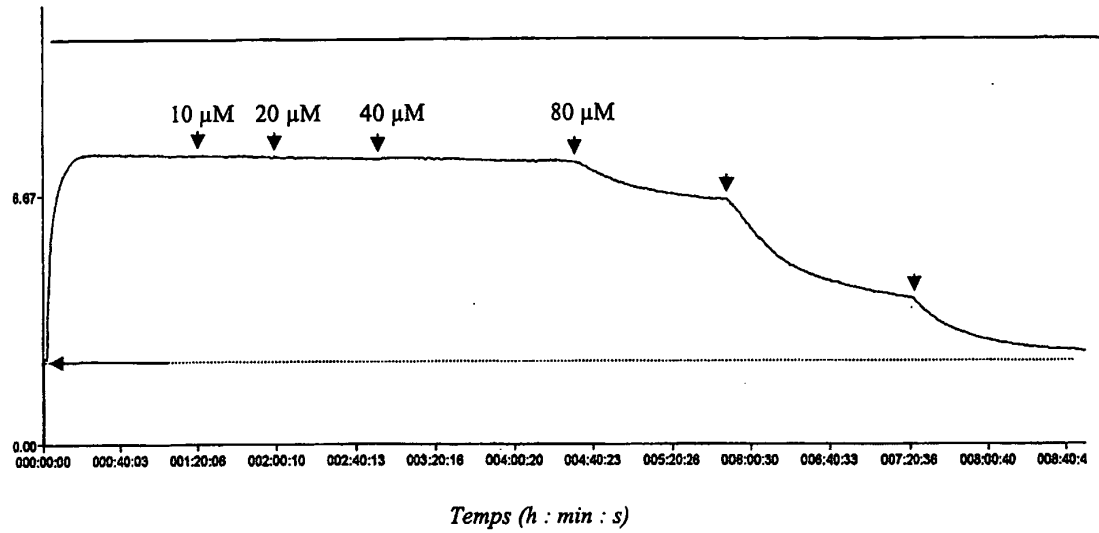


Figure 1

A.

Tension (en g)



B.

Tension (en g)

Milieu hyperpotassique

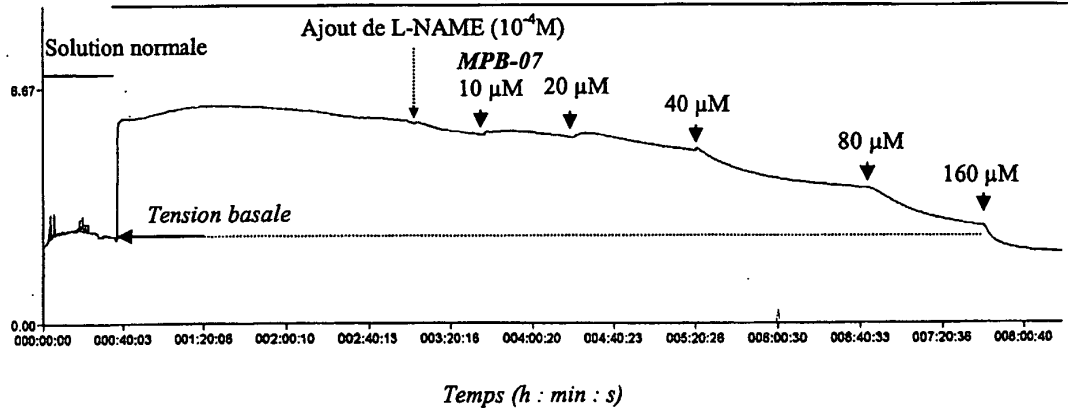
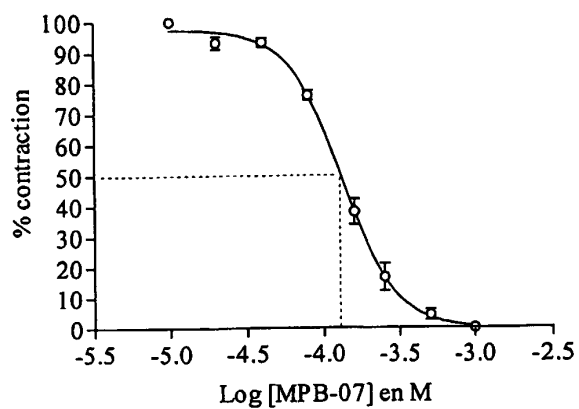
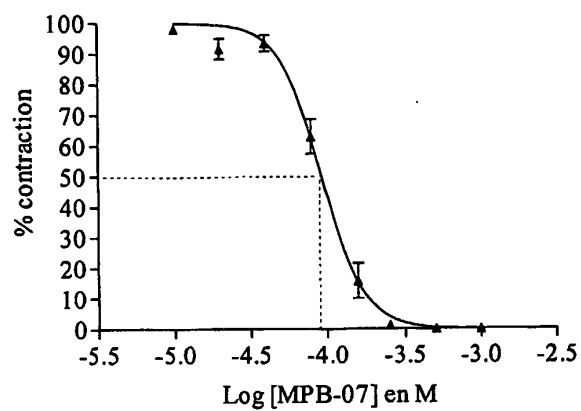


Figure 2

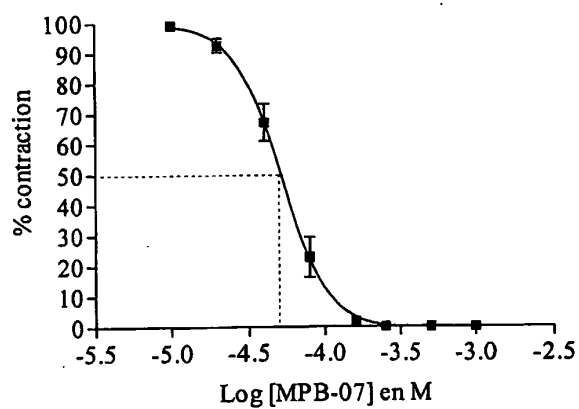
A.



B.



C.



D.

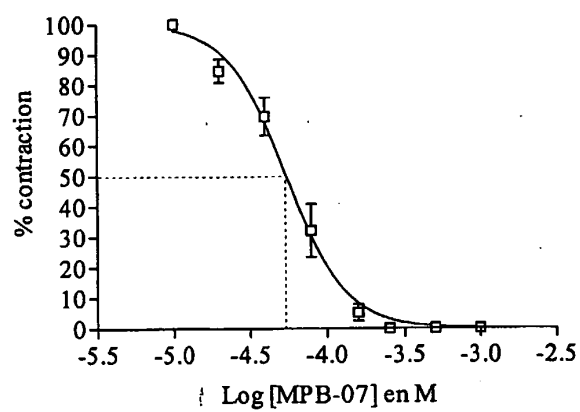
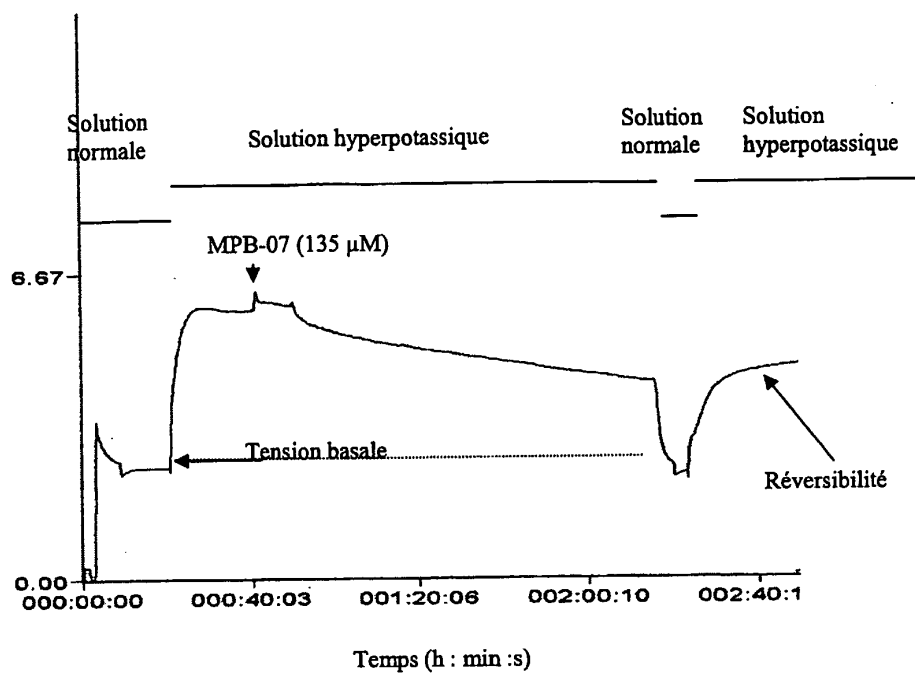


Figure 3

A.

Tension (en g)



B.

Tension (en g)

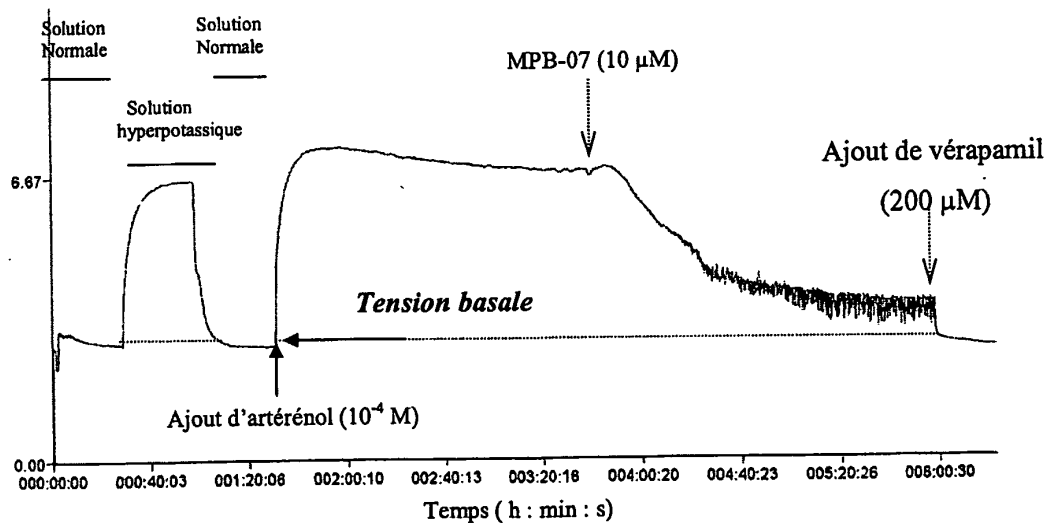


Figure 4

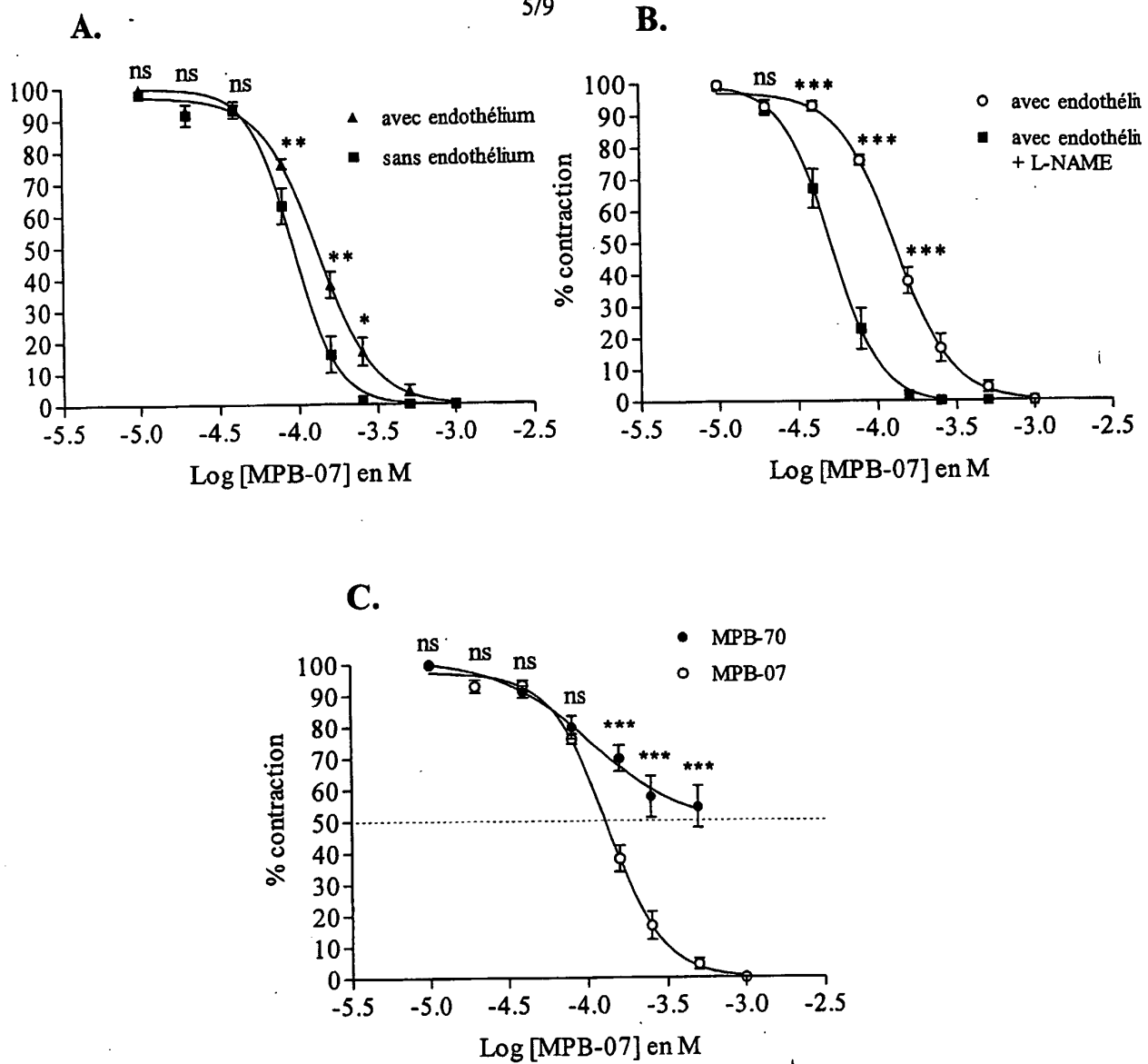


Figure 5

**Comparaison d'une gamme de
MPB-07 et de MPB-91 sur des
anneaux d'aorte avec endothélium
précontracturés en solution
hyperpotassique**

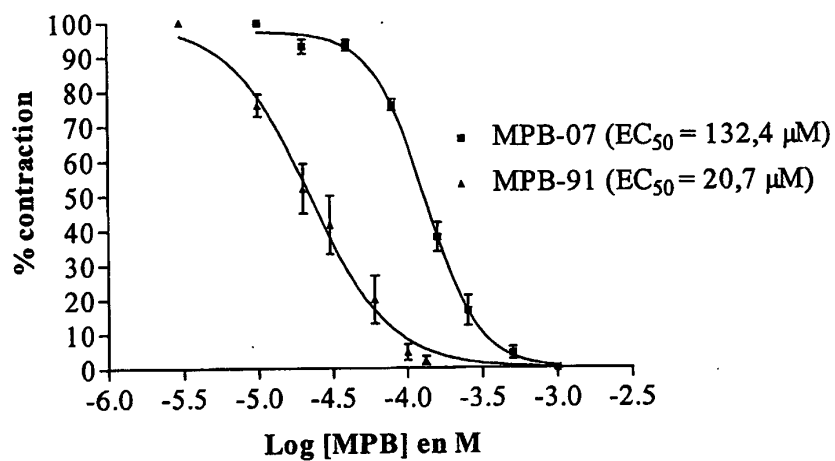


Figure 6

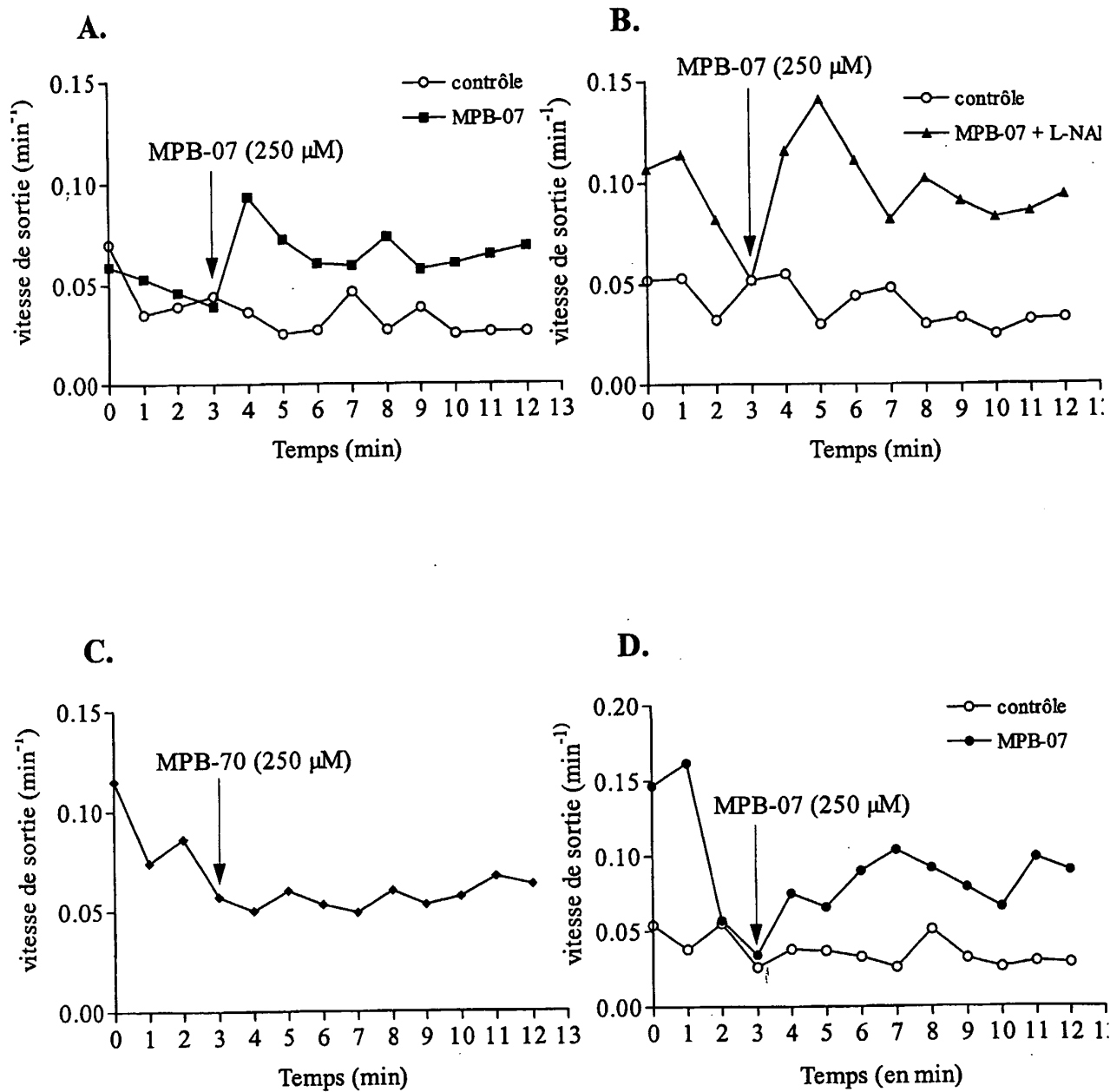


Figure 7

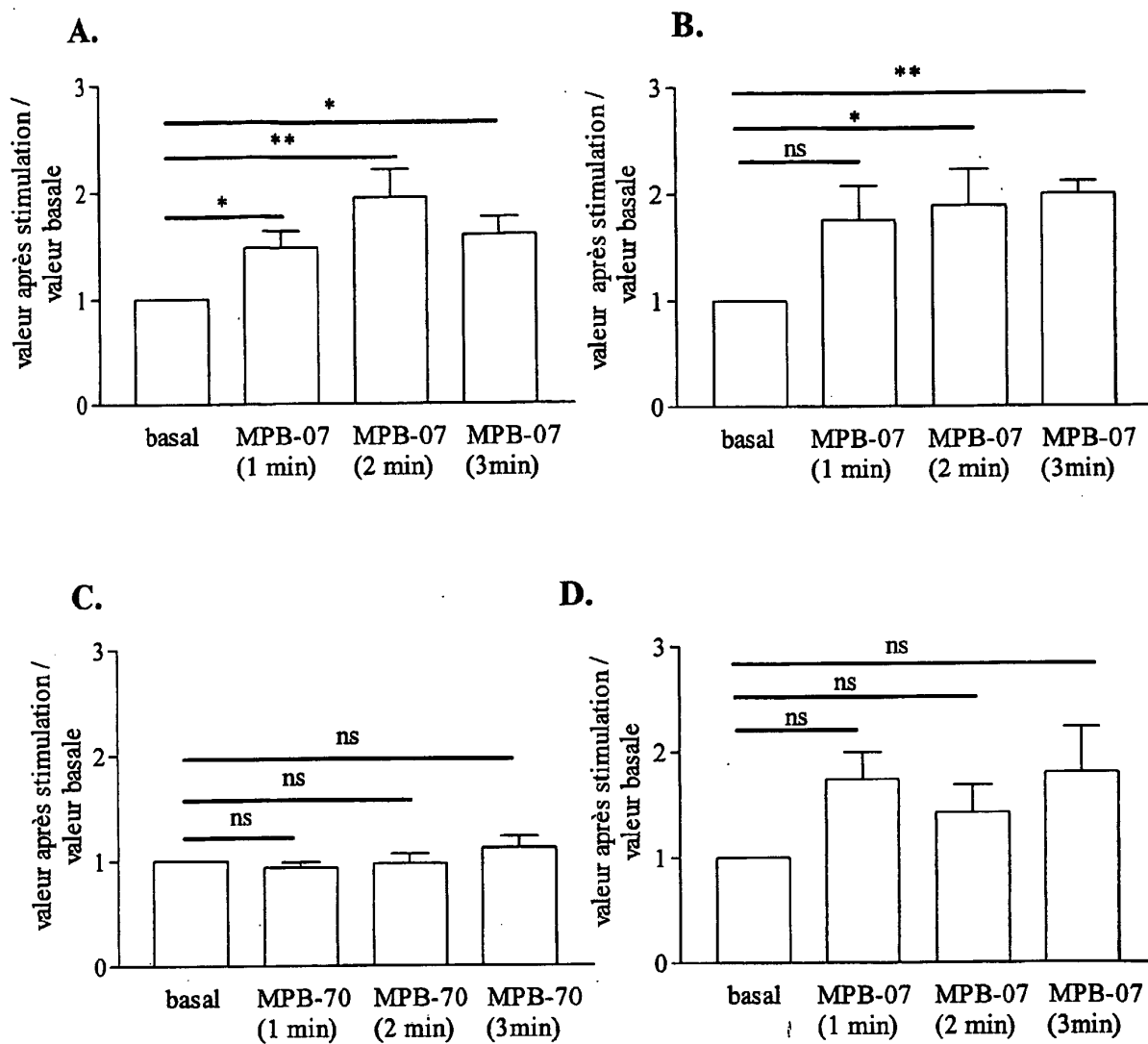


Figure 8

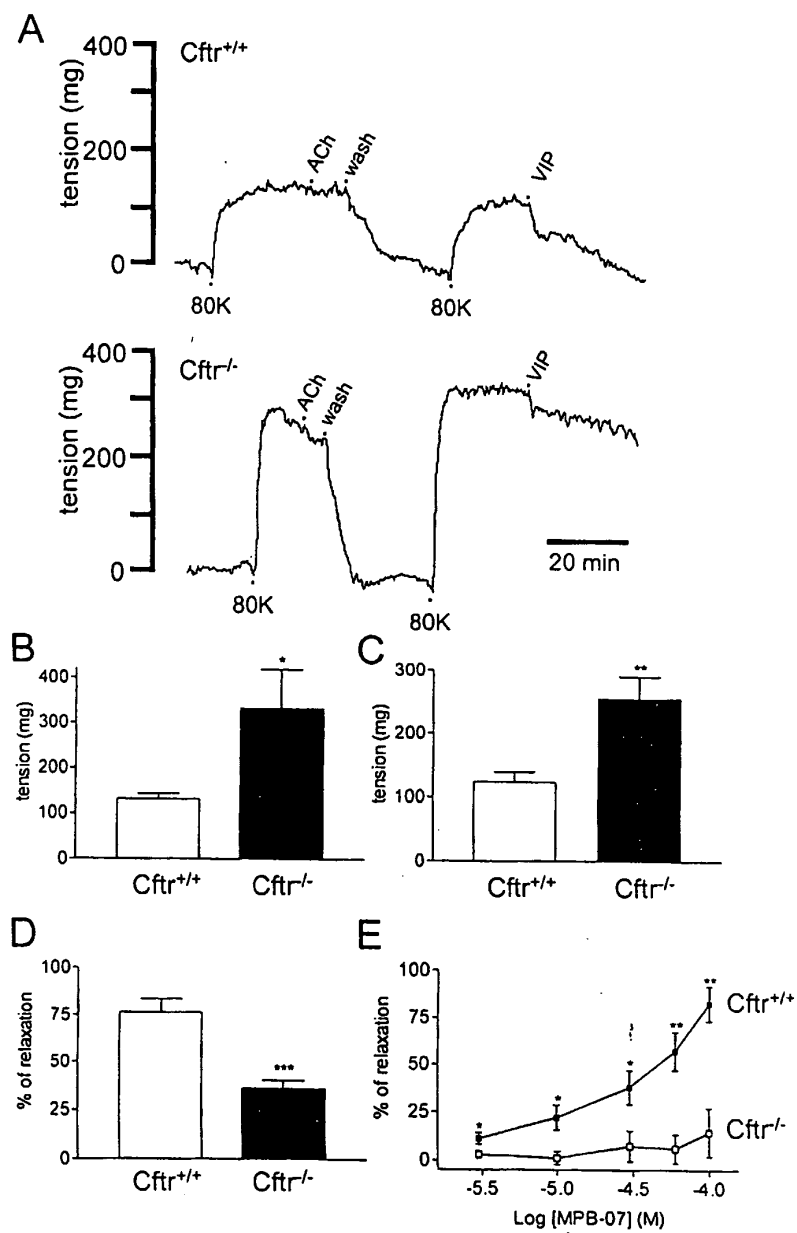


Figure 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/01688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D455/06 C07D471/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 05642 A (CNRS) 12 February 1998 (1998-02-12) cited in the application claims 1,7,11 -----	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 2003

Date of mailing of the international search report

08/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alfaro Faus, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte Application No

PCT/FR 03/01688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9805642	A	12-02-1998	
		FR 2751969 A1	06-02-1998
		CA 2258924 A1	12-02-1998
		DE 69710208 D1	14-03-2002
		DE 69710208 T2	18-07-2002
		EP 0937044 A1	25-08-1999
		WO 9805642 A1	12-02-1998
		JP 2000515863 T	28-11-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR03/01688

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07D455/06 C07D471/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07D A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 05642 A (CNRS) 12 février 1998 (1998-02-12) cité dans la demande revendications 1,7,11 -----	1

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 septembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/10/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alfaro Faus, I

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT 03/01688

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9805642 A	12-02-1998	FR 2751969 A1	06-02-1998
		CA 2258924 A1	12-02-1998
		DE 69710208 D1	14-03-2002
		DE 69710208 T2	18-07-2002
		EP 0937044 A1	25-08-1999
		WO 9805642 A1	12-02-1998
		JP 2000515863 T	28-11-2000
